

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

MAR 1999
VOL.41 No.2

目次

巻頭言

測定値とその意義

戸田 昭三……………1

報文

海産有毒成分測定へのLC/MSの応用

西尾 幸郎……………3

ラウンジ

SEMと私

梅林 力……………11

解説

環境ホルモン分析への対応

谷川 建一 原田 勝仁

横倉 武文 望月 康平……………12

OSDA-2000形 ウェーハ結晶欠陥解析装置の紹介

松井 繁 武田一男……………15

液体クロマトグラム分離の最適化支援ソフトウェア

出口 喜三郎 S.V.Galushko ……17

学会発表ミニファイル……………22

新製品紹介

D-7000G形

GPCソフトウエア発売……………10

日立走査電子顕微鏡S-4300……………14

日立コンピケム用高速精製システム(HTPA)……………24

環境分野向け高機能ガスクロ

G-7000形の紹介……………24

トピックス

分析展・全科展の報告……………2

日本分析化学会

第47年会開催さる……………21

巻頭言

測定値とその意義

Measurements and Their Values

戸田 昭三*



自分で分析機器や測定機に手を触れるような事をしなくなって大部の年月が過ぎた。指示薬の変色点を見つめながらビューレットから落ちる適定液や、天秤で重さを量る事に神経を集中したりして測定を行った。

このような操作の過程で、取り扱っている物の「化学、或いは化学的性質」の重要性を意識する事が出来た。その後、いわゆる機器分析が発達しても金属イオンと試薬が反応する色調の変化を見ながら、ノブを廻し色々調整しながら得られた数値をノートに書取り、後でスペクトルや検量線を作成する段階で測定対象の化学構造を考えながら分析を行ってきたように思う。得られた測定値と化学との関係を考えながら、数値の持つ意味を検討し解析を行ってきた。そうしなければ正確な、また繰り返し精度の良い分析結果を得る事は出来なかった。そのためには、分析化学の知識が重要であり、勉強し、努力をしてきた成果により測定値が提出されてきた。それでも、再現性の良い、より正確性があると思われる結果を得る事は難しかった。また分析化学会もそのような社会的要望に答えて発足し、あらゆる分野の方々が参加されて居られた。企業にいる人達も個人的に多くの方が学会の会員に加入されていた。

最近の化学分析に関する測定機は非常に便利になった。多くの研究者、開発者の努力により格段の改善がなされ、分析法はシステム化され、プログラムとして分析機器の中に組み込まれている。検量線用の標準溶液も市販されている。試薬を乾燥させたり、天秤使う事をしなくても、分析結果を手にする事が出来る。オートサンプラーに試薬を載せるだけで次々に測定値が得られる。その場にいないでも良い。打ち出される数値の意味を考える暇もない。その様に変化したおかげか、特に分析化学を習熟しない人でも検査結果、分析室等で仕事を遂行する事は出来る。分析名人を必要としなくなった。即ち、分析化学が普遍化され、特定の人のものではなくなった。そうなれば、何も小うるさい理屈に煩わされなくても目的の測定値が得られる。早く自分の研究に、仕事に測定値を活用したいと思うのは人情である。以前の分析法では、たとえば得られた赤外吸収スペクトルを解析するには多くの外のデータ、情報がなければなかなか正しい化学構造を推定する事は出来なかった。その過程で取り扱っている化合物の性質、使用目的、次に打たなければならぬ事項などを把握できた。今はコンピュータが可能性のある化学構造を示してくれる。この結果を信じきって仕舞う。その結果、分析化学会に

* 平成9年度 日本分析化学会会長、東京応化工業(株)取締役副社長

入会しないで分析機器を扱っている人が多くなった。研究会、装置企業の開催する講習会に出席すれば日常の業務の遂行は可能である。しかし、今一歩踏み込む必要がありはしないだろうか。本当の問題解決にはならない。

その上得られた数値はすぐにコンピュータで処理され意味もないような桁数の多い数値がならび、それが精度の良い分析結果と見なされてしまう事がある。中にはその様に測定できる機器分析法があるのだからその限界まで純粋な製品にすべきと言う要求まで飛び出す。

あくまでその分析値が何故必要か、どこまで分析したら良いのかを把握しなければ時間だけが無駄になって仕舞う。次々に打ち出される数値が何を意味するのか判断がつかない。経験の有る人ならば測定機に掛ける前に依頼人の意図が読み取れる。これほど迅速な分析法はない。

有機原料中の不純物イオンによると思われる障害が起きた。定量値は以前のものと変わらないと言う。試料の前処理を聞いただと、めのう乳鉢中で水を加え、丁寧に時間を掛けながらすりつぶして抽出し、何便繰り返しても同じ結果だと言う。完全に溶解するか、分解し抽出してから測定しなおしたところ、1000倍もの濃度差が観測された。前に測定した値は何の意味もなく、全く役に立たない分析結果である。余りにも便利になり、安易に取り扱いすぎた結果である。分析機器のプログラムソフトが良く、人的ミスも補正してくれるようになったとは言え、根本的なミスまでは補正してくれない。あくまで問題を解決しようとする意志と熱意が大ききものを言い、人の判断が全てを左右する。

特に最近の環境汚染問題の報道に接するとこの感じが強い。多くの新しい化合物を開発し、使用しながら生活の利便性、経済的利益を追求してきた結果が今日の環境問題に発展した面がある。人間の知識なんてたかが知れている。これまで障害を起こさないとされてきた物質

に於いて問題点が発見されてきたのであり、これらの化合物は広く利用され、環境中に散布されたものもある。十何年も前から指摘されてきていたのに、その当時に於いては無視か、無関心でいた人達が何故か感情的になってまで騒ぎ立てて居るように思えてならない。環境問題は一時的に大騒ぎするのではなく、ある期間正しい測定値を地道に蓄え、問題の解決に当たらなければならない。(pg/g)以下まで測定できるように分析法が確立されてきた。しかし、この様に濃度の極端に低い試料に対する分析値は果たして本当に正確なものであろうか。それは誰にもわからない事である。本当らしき濃度の保証値が示されている、構成主成分の似た標準試料を用いて分析法をチェックする必要がある、測定された数値の真の意味を明確に把握する事が大切である。間違った数値を元に色々議論しても問題の解決にはならないからである。

筆者略歴

戸田 昭三	
昭和6年1月1日生	
昭和29年3月	東京大学工学部応用化学科卒業
昭和29年5月	神奈川県工業試験所 技術吏員
昭和39年3月	東京大学工学部工業化学科 講師
昭和43年5月	同 上 助教授
昭和43年7月	東京大学農学部農芸化学科 助教授
昭和51年5月	同 上 教授
平成 3年3月	東京大学 退官
平成 3年4月	東京応化工業(株) 研究所長
平成 3年7月	同 社 取締役副社長
平成 5年4月	同 社 取締役副社長開発本部長(現在に至る)
平成 9年度	日本分析化学学会会長

Topics

分析展・全科展の報告



分析展の日立ブース環境ホルモンコーナー

'98分析機器展及び第27回全日本科学機器展がそれぞれ'98年9月2日から3日

間、10月27日から4日間開催された。

分析展において、“Hitachi Analytical Solution 子供達の未来を守るために”という日立グループの新しいテーマを発表し、人々の健康と環境保全に注力する日立の姿勢を打ち出した。

健康に関係の深いコーナーとして、医薬品コーナー、生化学コーナーを設けた。ここでは、LC-3DQMS、コンビナトリアルケミストリー用高速精製システム、高速液体クロマトグラフおよびバリデーションソフトを始めとする各種ソフトウェアに注目が集まった。

環境関連では、環境ホルモンコーナーと水質コーナーを設けた。ここでは、GC-3DQMSと高機能GCが最も注目された。水質管理システムは、分析展では異色の存在であったが、多くのカタログ請求を得た。素材コーナーでは、

SEMとEDXを統合させたSEMEDXが最も多くの客を集めた。

今回の分析展の新しい企画の一つが、テーマコーナーであった。110インチのスクリーンで発表を行い、発表の合間には“子供達の未来を守るために”というテーマの背景にある日立のミッションを映像の形で流した。特に環境ホルモンの発表のあるときは、通路まで人が溢れ、隣のブースに気を遣う程の盛況であった。

従来は汎用機指向であった全科展においても、分析展と同じテーマのもとに、健康・環境関連の製品に重点を置いた展示を行った。とくに環境ホルモン関連は、他の分析機器メーカーも分析展以上に注力し、全科展としては、機器メーカーの姿勢が前面に出た展示会となった。

報 文

海産有毒成分測定へのLC/MSの応用

LC/MS Application for Marine Biotoxins

西尾幸郎*

1. はじめに

わが国での有毒魚介類の喫食による中毒といえばフグ毒が有名である。近年はこれに加えて、有毒赤潮プランクトンに原因した、二枚貝の麻痺性貝毒や記憶喪失性貝毒の蓄積、さらにアオブダイ毒化などが知られるようになってきている。食品衛生と安全な水産食品供給の両面の実現のため、またこれら有毒成分の生体内での解毒代謝を明らかにするために、超精密分析手法であるLC/MSの適用が必要になってきている。従来、海産毒の定量は、マウスによる生物検定法を主に、HPLC、免疫抗体法を併用して実施している。二枚貝の場合、可食部1gが4 MU (mouse unit) を超えると出荷規制が実施される。このため厳密に毒物と同定できる手法としてのマウス法に根強い支持がある。LC/MS法の本分野への導入は、絶対分析の特徴から、将来マウス法に代わる高感度測定法としての期待がある。

2. スベスベマンジュウガニのフグ毒関連物質

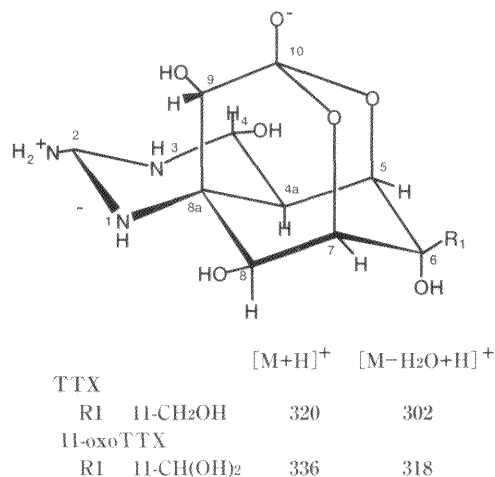
徳島県南部の浅川湾一帯に分布するスベスベマンジュウガニ *Atergatis floridus* はオウギガニ科に属する毒ガニで、わが国では千葉県以南から琉球列島沿岸に生息することが知られている。その毒組成は神経毒のフグ毒 tetrodotoxin (TTX) を主成分とするもの¹⁾、麻痺性貝毒 saxitoxin からなるもの²⁾、沖縄県石垣島などのように同一採取地域でも個体によって麻痺性貝毒とフグ毒のどちらかとなる³⁾ などと、生息地域によって異なっている。浅川湾産スベスベマンジュウガニは、フグ毒と麻痺性貝毒の両方を合わせ持つことが特徴となっている。

浅川湾産 *A.floridus* は生息環境に起因してか、毒構成成分組成が複雑で、しかも新しいTTX関連物質を含有していた⁴⁾。この新規のTTX関連物質はBio-Rex 70などのイオン交換樹脂と反応して既知成分のTTXやその誘導体に変換する性質を有しており、このためできるだけ温和な精製条件を検討する必要があった。そこで、ODSカラムを分取に適用し、FAB MSをHPLCの検出器とするLC/MSに発展させ、新規TTX関連物質の分離・同定をより精確にする方法の開発を進めた。こうした分離・分析手段の高度化を基礎に *A.floridus* から分子量335のoxo-tetrodotoxinと推定されるTTX様有毒物質（以下TTX-Lと略記）の存在を明らかにすることができた。

移動層として、1mM heptafluorobutyric acid（以下HFBAと略記）の1%グリセリン溶液を使用し、流速0.5ml/minとした。用いたODSカラムはWakosil 5C18 4mm φx30cm（和光純薬）であった。LC/MSでの質量分析の結果をFigure 1に示す。 m/z 320と336、それに紫外部210nmでの吸光度



(TIM) でマスキロマトグラムを作成した (Figure 1. A)。保持時間 (RT) 25.0と26.5分に m/z 320 で検出される2成分が溶出した。後者は Figure 1.C のマスペクトルで m/z 320 の $[M+H]^+$ を得たことから、TTXと判断した。前者の成分はTTX-Lで m/z 336を基準ピークとしていた。



TTX-Lを特徴づける主なフラグメントは Figure 1.Bの m/z 318, 336と考えられた。この様な判断はFigure 1.Dに示すTTX-Lのマスペクトルに基づいて考察された。 m/z 336をTTX-Lの分子量関連イオン $[M+H]^+$ とすれば、 m/z 320で測定されるTTXにOH基が1つ付加した構造が推定された⁵⁾。本物質はArakawaらのNMR解析により、11-oxo-tetrodotoxinと同定された⁶⁾。

3. 記憶喪失性貝毒

1987年11月から12月にかけて、カナダ大西洋沿岸のプリンス・エドワード島東部で養殖ムラサキイガイの喫食による食中毒が発生し、200人以上の人が胃腸や神経障害

* 四国大学短期大学部化学研究室 教授 農学博士

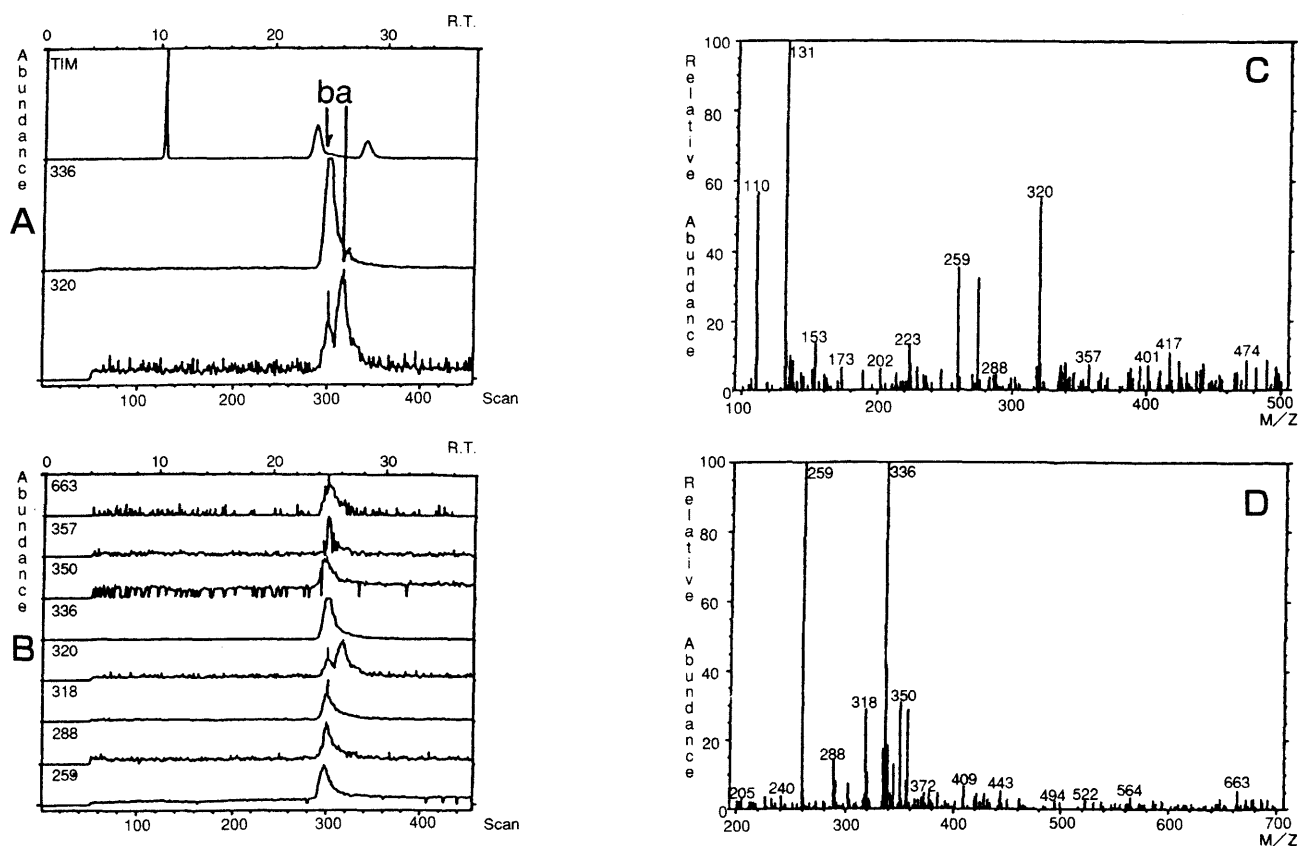


Figure 1. LC/FAB MS spectra TTX-L. A and B, Mass chromatograms of purified TTX-L (peak b) and TTX (peak-a). C, FAB mass spectrum of peak a. D, FAB mass spectrum of peak b.

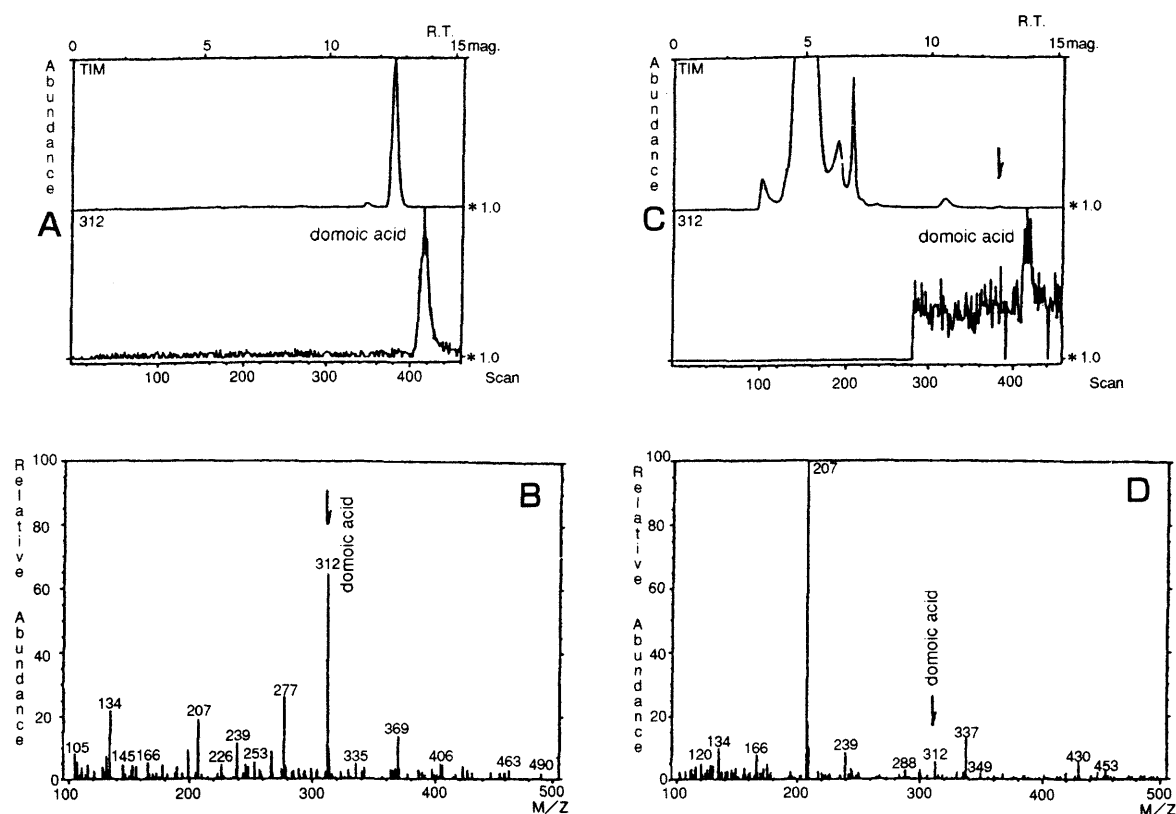
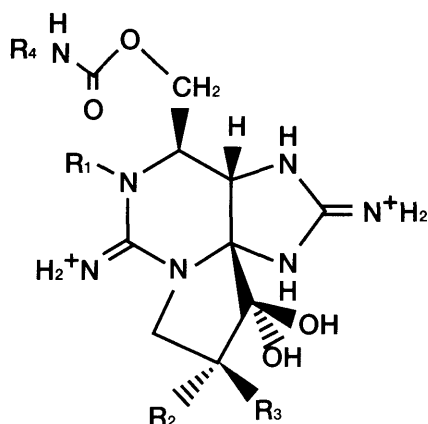


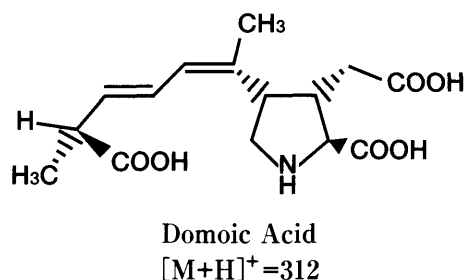
Figure 2. LC/FAB MS spectra of standard domoic acid and an aqueous extract of mussel digestive glands collected from Tachibana Bay. A, Mass chromatogram of standard domoic acid. Domoic acid was monitored at m/z 312 = $[M+H]^+$ and at 242 nm (total ion monitor: TIM). B, Mass spectrum of standard domoic acid. C, Mass chromatogram of mussel digestive glands extract. D, Mass spectrum of mussel digestive glands extract.



	R1	R2	R3	R4	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
GTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	412	
GTX2	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	396	
GTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	H	396	
GTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	412	
GTX5	H	H	H	SO ₃ ⁻	380	
GTX6	OH	H	H	SO ₃ ⁻	396	
PX1(C1)	H	OSO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻		474
PX2(C2)	H	H	OSO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻		474

を伴う慢性疾患に見舞われた。重傷者は昏睡に陥り4名の死者と12人の記憶障害後遺症患者を数えた。中毒原因物質は domoic acid と同定され⁷⁾、致死量200~300mgと推定されている。ムラサキイガイの毒化原因はその海域に赤潮を形成していた珪藻 *Nitzschia pungens* とされた⁸⁻⁹⁾。本種は浮遊性であることから後に *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries* とされ、同属原因種の数も増加している¹⁰⁾。日本では domoic acid による食中毒は報告されていないが、今後本物質に原因した記憶喪失性貝毒発生の可能性がないとは言えない。

徳島県橘湾より1992年の春にムラサキイガイ20個体を採取し、その中腸腺を0.1N塩酸にて加熱抽出後、限外ろ過を行いLC/MS分析試料とした。HPLCはQuilliamら¹¹⁾の方法に基づき、Wakosil 5C18 4mmφ x 30cm (和光純薬) にトリフルオロ酢酸にてpH3.0とした15%アセトニトリル1%グリセリン溶液を使用した。Figure 2. AとBは標品



のマスクロマトグラムとマスペクトルである。そして、Figure 2. CとDにムラサキイガイ試料のそれぞれを示した。標品 domoic acid は[M+H]⁺ m/z 312で測定され、LC/MS法が本物質の検出に適していることが明らかとなった。そして、ムラサキイガイからは、Figure 2. C下段

m/z 312でのモニター結果から domoic acid であることが確認された。LC単独の測定結果より、ムラサキイガイ中腸腺の domoic acid 含有量は4.3μg/gと計算された。

4. 麻痺性貝毒

麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish Poisons, 以下PSPと略記) は渦鞭毛藻類に属する *Alexandrium catenella* や *A. tamarense* が産生する神経毒で、主としてプランクトンフィーダーである二枚貝が中腸腺などに蓄積し、毒化する。これを誤って食べると中毒を起こす。中毒症状はフグ中毒に似ており、通常食後30分程度で、口唇、舌、顔面のしびれや、灼けつくような感じが現れ、徐々にこの症状が首や腕、四肢末端にまで広がるとともに麻痺に変わり、随意運動が困難となる。重傷の場合には、運動失調が起こり、体が宙に浮いたように感じる。言語障害、虚脱感、頭痛、発汗、口渇、吐気、嘔吐などが現れ、麻痺は次第に進む。最後に呼吸麻痺で死亡するが、意識は直前までははっきりしているといわれている。致死時間は12時間以内が多く、一般にこれを越えると順調に回復する。

わが国では、1948年以来これまでに死亡4名を含む10件ほどの中毒患者の発生を見ている。地域的には北海道から九州にいたる各地で二枚貝の毒化がおきている。特に東北、北海道では重要な水産物である養殖ホタテガイが、そして瀬戸内海では養殖マガキが毎年のように出荷規制を受けることから経済的被害が大きい。

PSPは saxitoxin とそのN1位にOH基を導入した neosaxitoxin を基本構造としている。C11位あるいはN21位のモノスルホン化 PSPとして GTX1-GTX6 が、さらに両位をジスルホン化したPX1-PX4¹²⁾ (C1-C4)¹³⁾ がよく知られている。これらPSP成分のLC/MSは、これまでに述べた tetrodotoxin や domoic acid に比べ簡単ではない。最近 sonic spray ionization法 (SSI) が開発され、本法がPSPのLC/MS検出器として有効であることが明らかとなった。

LC/SSI MS法でのPSP分析のため、PX群の分離には日立ゲル3013N 4mmφ x 15cm イオン交換樹脂カラムを移動層1mM HFBAで、そしてGTX群には I nertsil ODS カラム4.6mmφ x 15cmを移動層5mM HFBAで使用した。いずれも流量1ml/min, 吸光度210nm (TIM) でクロマトグラムを作成した。SSIの測定には日立M-8000を用いた。

ネガティブモードで PX1, PX2 の[M-H]⁻ m/z 474 を高感度で検出することに成功した (Figure 3)¹⁴⁾。PX1, PX2とも[M-H]⁻, [M-H-H₂O]⁻を明瞭に捕らえていた。ポジティブモードで測定すると (Figure 4), 脱スルホンピークが、その脱水ピークを伴って検出された。11位スルホン酸の立体異性に従って、m/z 298, 316が逆相関で検出され、両マスピークの比を計算することで、α, β位を決定できる可能性を得た。C12位のジェミナルジオールが保存されている場合、β配位のスルホン基周辺プロトン相互間に、α配位より強いNEO が NMRで測定されている¹⁵⁾。脱水、脱スルホン基の m/z 298 がPX2にPX1より強く観測された結果と関係していると考えられる。

GTX群のLC/MS測定結果を Figure 5-7に示す。ポストカラム蛍光誘導体HPLC法¹³⁾で蛍光検出すると GTX1-GTX5の5成分が確認される有毒画分を LC/SSI MSに供試した。その結果、[M+H]⁺ m/z 396を有する GTX6が RT

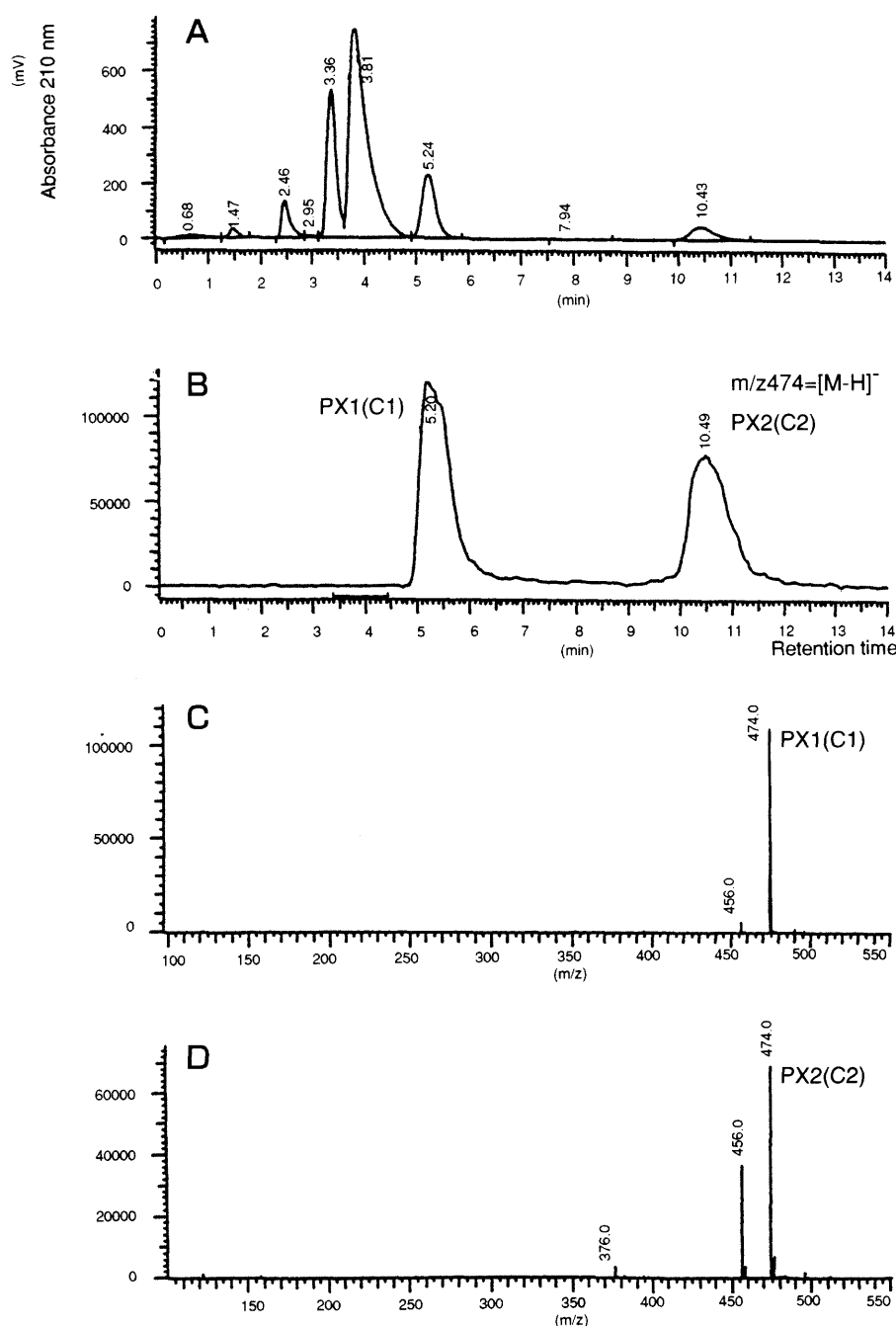


Figure 3. Liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrography of PX1 (C1) and PX2 (C2) operated in negative mode. A), HPLC elution profile of PXs from a Hitachi anion exchange resin 3013N column. Toxins were monitored at 210nm. B), Mass chromatogram of PX1 and PX2 monitored at m/z 474= $[M-H]^-$. C), Mass spectrum of PX1. D), Mass spectrum of PX2.

6.62 分に、未同定成分 GTX-uk1 が 7.67分、GTX3 が 8.48 分に認められた。また、 $[M-SO_3+H]^+$ m/z 316でのマスクロマトグラムから GTX2 が RT10.49分に検出された (Figure 5)。 $[M+H]^+$ m/z 412 を有する GTX4は、RT9.54分に検出された。 $[M-SO_3+H]^+$ m/z 332で見ると、未同定成分 GTX-uk2 が RT 3.61 分に、そして、GTX1 が RT 10.92 分に認められた (Figure 6)。GTX5 の $[M+H]^+$ m/z 380を有する成分は、RT 6.92, 7.25分に2成分検出された。 $[M-SO_3+H]^+$ m/z 300で見ると、この2成分はイオンの増大によりシングルピークとなった。この主成分の他に RT 8.03, 8.95分の2成分が微量検出された (Figure 7)。これらは GTX5の保存中に誘導され、セルロースアセート膜電気泳動にて Rm0.38, 0.48 に認められる微量分解物についての結果と一致する内容であった¹⁶⁾。

新開発の LC/SSI-MS を麻痺性貝毒の GTX 群に適用したところ、GTX1 から GTX6 の PSP 成分それぞれが、 $[M+H]^+$ 、または $[M-SO_3+H]^+$ で明瞭に検出・同定された。GTX6 は LC/SSI-MS で HPLC より高感度に測定された。さらに従来 HPLC 法で捉えられなかった GTX-uk1, GTX-uk2 の存在が浮かび上がってきた。分析条件を新たにすると、未同定成分数は今以上に増大する可能性がある。これらの物質は、マススペクトルから判断して GTX1, GTX2, GTX5, GTX6 に関連した異性体と推測される。これら異性体の化学的性状、マウス毒性、二枚貝での蓄積形態等について新たな興味を持たれることとなった。

文 献

- 1) Noguchi T, Uzu A, Koyama K, Maruyama J, Nagashima Y,

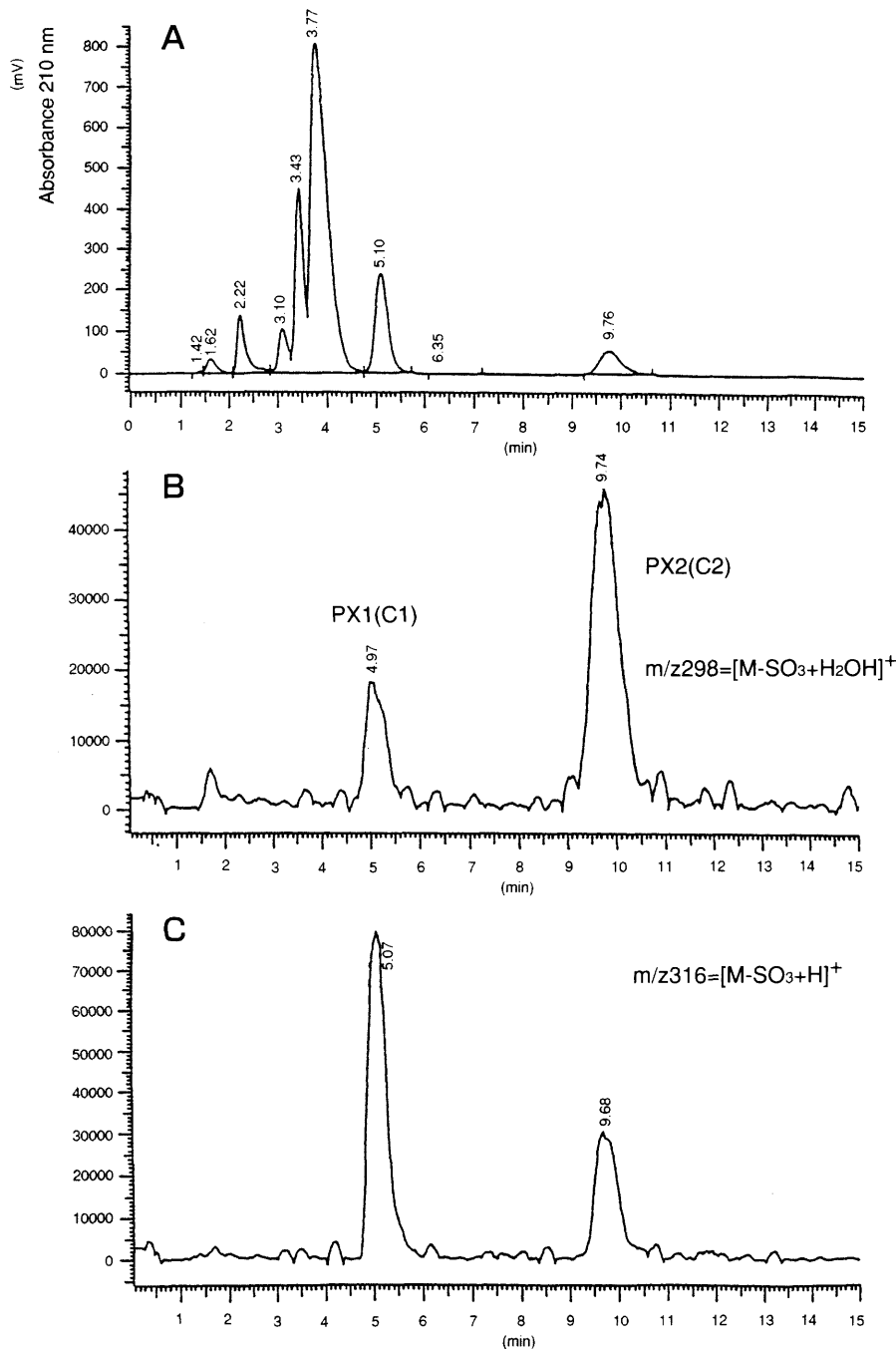


Figure 4. Liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrography of PX1(C1) and PX2(C2) operated in positive mode. A), HPLC elution profile of PXs. B), Mass chromatogram of PX1 and PX2 monitored at $m/z 298 = [M-2(SO_3)-H_2O+H]^+$. C), $m/z 316 = [M-2(SO_3)+H]^+$.

Hashimoto K : Occurrence of tetrodotoxin as the major toxin in a Xanthid Crab *Atergatis floridus*, Nippon Suisan Gakkai, 49 : 1887-1892, 1983.

- 2) Noguchi T, Konosu S, Hashimoto Y : Identity of the crab toxin with saxitoxin, Toxicon, 7 : 325-326, 1969.
- 3) Noguchi T, Arakawa O, Daigo K, Hashimoto K : Local differences in toxin composition of a Xanthid Crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa, Toxicon, 24 : 705-711, 1986.
- 4) 西尾幸郎 : 浅川湾産スベスベマンジュウガニからフグ毒関連物質の分離について, 四国女子大学紀要, 11 : 31-40, 1986.
- 5) 橋本多美子, 西堀尚良, 西尾幸郎 : 浅川湾産スベスベマンジュウガニが含有するtetrodotoxin 様有毒物質について, 四国大学紀要自然科学編, 2 : 93-100, 1986.
- 6) Arakawa O, Noguchi T, Shida Y, Onoue Y : Occurrence

of 11-oxotetrodotoxin and 11-nortetrodotoxin-6(R)-ol in a Xanthid Crab *Atergatis floridus* collected at Kojima, Ishigaki Island, Fisheries Science, 60 : 769-771, 1994.

- 7) Wright JLC, Boyd RK, Defreitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak V, Quilliam MA, Ragan M, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Gilgan M, Richard DJA, Dewar D : Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern P.E.I., Canadian Journal of Chemistry, 67, 481-490, 1989.
- 8) Subba RDV, Quilliam MA, Pocklington R : Domoic acid, a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture, Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science, 45, 2076-2079, 1988.
- 9) Bates SS, Bird CJ, Defreitas ASW, Foxall R, Gilgan M,

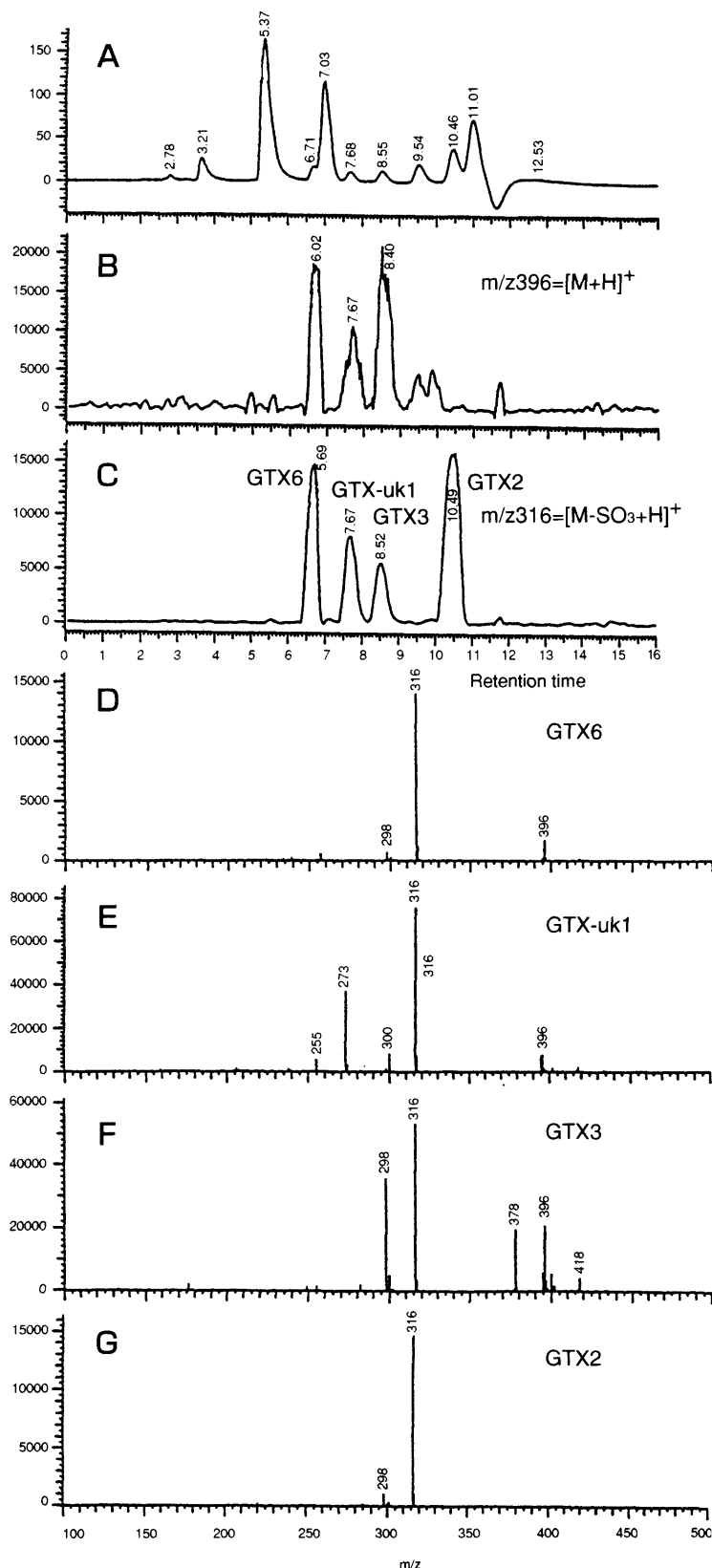


Figure 5. Liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrography of GTX2, GTX3 and their isomers operated in positive mode. A), HPLC elution profile of PXs from a Inertsil ODS column. Toxins were monitored at 210nm. B), Mass chromatogram of toxins monitored at m/z 396= $[M+H]^+$, and C) at m/z 316= $[M-SO_3+H]^+$. D)-G), Mass spectra of GTX2, GTX3, GTX6, and their isomer GTX-uk1.

Hanic LA, Johnson GR, Mcculloch AW, Odense P, Quilliam MA, Sim PG, Smith JC, Subba RDV, Todd ECD, Walter JA, Wright JLC : Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada, Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science, 46, 1203-1215, 1989.

- 10) Wright JLC, Quilliam MA : Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons, "Manual on harmful marine microalgae", p.113-133, UNESCO, Paris, 1995.
- 11) Quilliam MA, Sim PG, Mcculloch AW, Mcinnes AG: High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton, International Journal of Environmental

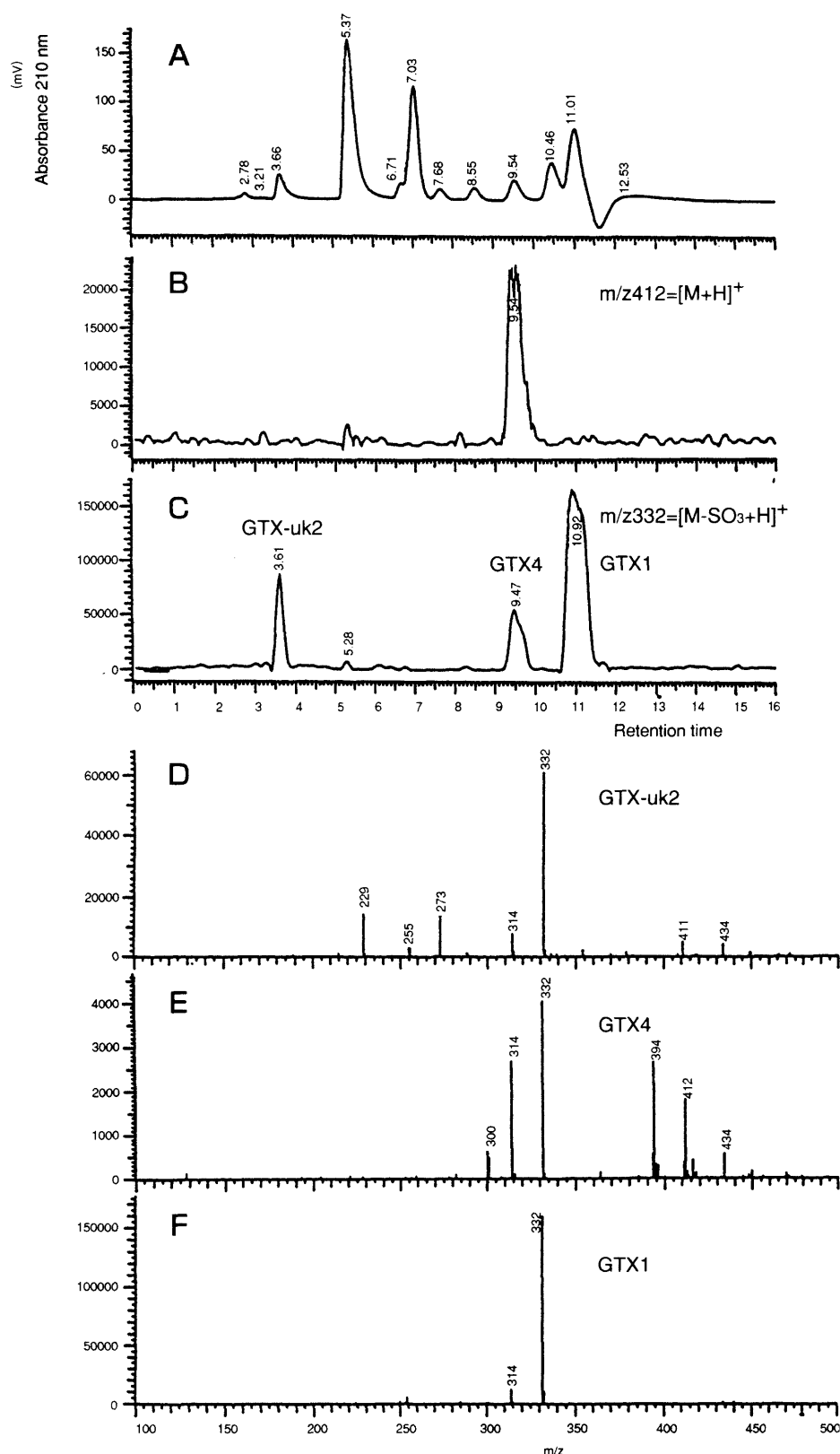


Figure 6. Liquid chromatograph/sonic spray ionization mass spectrography of GTX1, GTX4 and their isomers operated in positive mode. A), HPLC elution profile of toxins from a Inertsil ODS column. Toxins were monitored at 210nm. B), Mass chromatogram of toxins monitored at $m/z 332 = [M-SO_3+H]^+$. D)-F), Mass spectra of GTX1, GTX4 and their isomers GTX-uk2.

- Analytical Chemistry, 36, 139-154, 1989.
- 12) 野口玉雄: 生理活性物質・天然物, "水産利用化学", p.161-185, 恒星社厚生閣, 東京, 1992.
 - 13) Ohshima Y: Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons, "Manual on harmful marine microalgae", p.81-94, UNESCO, Paris, 1995.
 - 14) 西尾幸郎: アサリと二枚貝の麻痺性貝毒分解機構の解明, "平成9年度貝毒対策事業報告書", 水産庁, 東京, 1998
 - 15) Onodera H, Satake M, Oshima Y, Yasumoto T, Carmichael WW: New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*, Natural Toxins, 5, 146-151, 1997.
 - 16) Nishio S, Noguchi T, Onoue Y, Maruyama J, Hashimoto K, Seto H: Isolation and properties of gonyautoxin-5, an extremely low toxic component of paralytic shellfish poison, Nippon Suisan Gakkaishi, 48: 959-965, 1982.

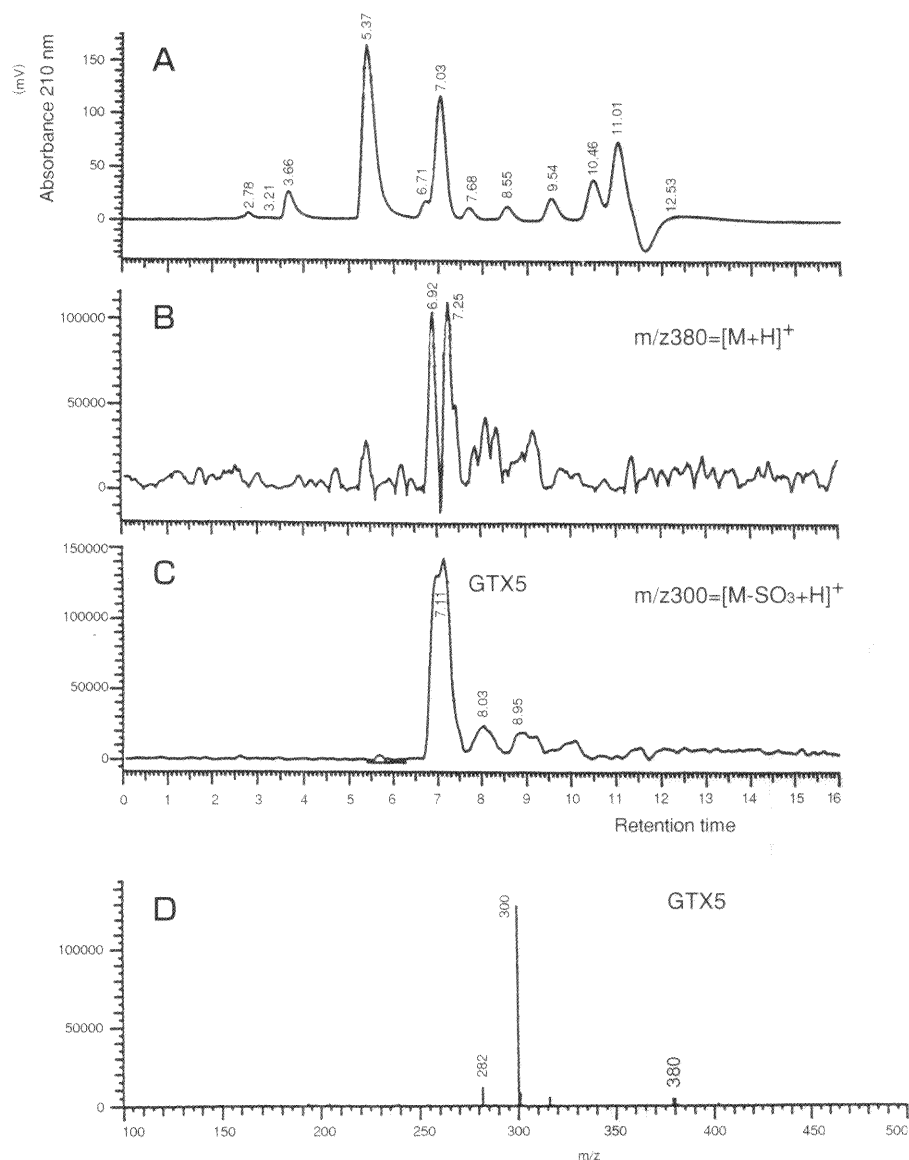
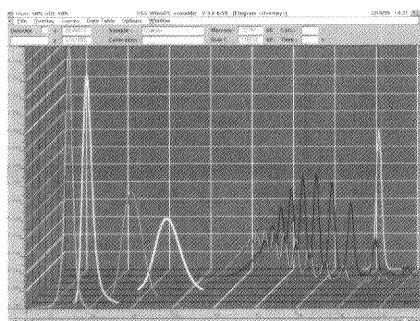


Figure 7. Liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectroscopy of GTX5 and its isomers operated in positive mode. A), HPLC elution profile of PXs from a Inertsil ODS column. Toxins were monitored at 210nm. B), Mass chromatogram of toxins monitored at m/z 380= $[M+H]^+$, and C) at m/z 300= $[M-SO_3+H]^+$. D), Mass spectrum of GTX5.

新製品紹介

D-7000 G形GPC ソフトウェア発売

ご好評いただいておりますD-7000形アドオンユーティリティに、GPCソフトが加わりました。D-7000形で収集されたクロマトデータをインポートし、GPC計算及びその結果を1ページのレ



ポートとして出力します。各ウィンドウが相互にリンクしており、ベースラインの変更、計算区間の指定が、即、GPC計算結果に反映します。OLEなら

では操作性の良さが特長です。

合成ポリマーのキャラクタリゼーションに大きく影響する分子量分布を求める手段として、本製品をご活用ください。

■主な仕様

- ・1-7次の多項式でカーブフィティングされた、各種ブロード校正曲線をサポート。
- ・平均分子量、多分散度、微分分子量分布の計算を1ページのレポートで出力。
- ・各ウィンドウがインターラクティブに対応し、OLEならではの使いやすい操作性。

ラウンジ



SEMと私

SEM and I

梅林 力*

中学生時代の夏休みのある夕方、私は一匹のクモが網を張るところを観察した。8本の脚を巧みに使う無駄のない動き、理にかなった造網過程、そして作り上げられた芸術的な網のすばらしさなどに、私はすっかり魅了されてしまった。以来四十余年、私はクモから離れられない人生を送ることになった。

大学生時代、私が研究テーマにクモを選んだのは、この中学時代の感激があったからだ。私の大学入学は昭和28年で、その頃はクモの図鑑さえ無く、機械や道具も不十分な時代であった。私のテーマはクモの生態と出糸器官との関係である。光学顕微鏡による出糸突起の観察は試料作りのむずかしさ、焦点深度の限界、「ウデ」の悪さなどでなかなかかどらなかった。機器類も学生が自由に使えるというわけではなかった。ミクロトームを個人で購入したいと思える教授に相談したが、頭から相手にされなかった。当時このような機具は高価で、研究室にはあっても個人で持つようなことは考えられない時代であった。言い訳になるが、今思うと、光学顕微鏡などの倍率も光源も不十分で使いにくかったし、その他の器具も十分とはいえなかった。学生として時間がとれないこともあり、研究といえるほどの結果は出せなかった。しかし、当時の研究者は、そういう条件の中で工夫し実に立派な研究をなさっておられたのだから、頭が下がる。

小学校の教師になると仕事を中心となり、研究したい気持ちはあったが開店休業状態が続いていた。それでも生物顕微鏡と解剖顕微鏡を買い、観察や解剖を細々と続けていた。

やがて明石製作所でWET-SEMが開発された。話しを聞きに出かけた。SEMでクモを見たいという気持ちがぐんと強くなった。しかし、当時の電子顕微鏡は医学や企業の方では力を発揮していたが、クモを見るなどでということには全く使う機会は与えられない高嶺の花であった。それでも一度でいいからクモをSEMで見たいという思いは消えなかった。そのうち、現職教員の大学院派遣の制度ができ兵庫教育大学が設置された。そこにSEM（日立S-450）が備えられたのを知り受験した。47歳からの2年間ではあったが、大学院生としてSEMを用いてクモの研究をすることができた。SEMで初めてのクモを見たとき「これだ!!」と思いとても感激した。私の予想した通りのすばらしい映像を目で見て写真に残せるのだ。

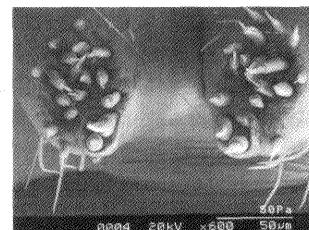
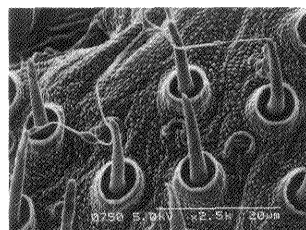
日本電子顕微鏡学会に入会してSEMの勉強を始めたのは1991年だった。サマースクールで田中敬一先生にお会いし、いろいろご指導を受けることができた。これが私とSEMの生活の始まりだった。後年、田中先生のご好意

で日立のN-SEMでクモを見る機会を与えられ、N-SEMにすっかり魅せられた。日立の方々からデモ用の機械があるので見に来たらとか、学会を通じてお会いできた大学の先生方からも、見たい物があったら持って来たらなどのお誘いもあったが、時間的な制約もあるし、当方の遠慮もあるしで、なかなか実行できなかった。勤務が小学校では、SEMを使用する機会もないし、退職してからも可能性はないしで、これは個人的に持つしかないと思っていた。そのうち、田中先生から、「クールステージが付いたので見に来ないか」との親切なお誘いを受けクモを見せて頂いた。薬品による固定や脱水、臨界点乾燥も不要で、クモの乾燥も減少できる。私の望むクモの研究にはもってこいだと思った。心の中で「絶対購入して自由にクモを見よう」と強く決心した。田中先生には、いろいろ親切にお教え頂き心から感謝している。田中先生とお会いできなければ、私とSEMとの生活はあり得なかっただろう。

退職を機に、SEM設置条件の良い場所探し、電磁波等の測定、建物建築、SEM選定・発注を経てSEMが届いた。自分で好きな時に、好きな物を、自由にSEMで観察することなど夢にも思わなかったことが実現した今、夢の中にいるような生活を送っている。材料が手に入ったら、ウォーミングアップを入れても30分で映像が見られるのだ。

SEMで見るクモの出糸突起は、予想以上に複雑で変化に富んでいる。生態が同じようでも、種が異なればかなりの違いがあり、成長に伴う出糸器官の変化を追い比較していくと、生物進化の道のりもたどることもできそうだし、とても興味がある。出糸器官の大きさ・型・数など一目で分かり、SEMの威力は実にすばらしいことを改めて感じている。

多くの人々に嫌われ無視されてしまうクモではあるが、材料を自分の体内でつくり、道具の網を造り設置し、獲物を捕えて暮らす、こんなクモに魅力があるのは当然ではないだろうか。日立の方々には、さらに使い易く優秀な機械の開発を今後ともよろしくお願いします。



クモの出糸突起の上にこのような出糸管がたくさんあり、一本一本からこのように糸が出る。

* 蜘蛛研究家、日本蜘蛛学会会員、日本電子顕微鏡学会会員

解説

環境ホルモン分析への対応

Coping with analysis of endocrine disruptors

谷川 建一* 原田 勝仁*

横倉 武文** 望月 康平**

1. はじめに

(1) 環境ホルモンとは

環境問題、人間の健康への関心が高まる中、環境ホルモンが昨年来話題を集めている。

環境ホルモンとは「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」を意味する。環境ホルモンはホルモン作用を攪乱することを通じて、生殖機能を阻害したり、悪性腫瘍を引き起こすなどの悪影響を及ぼしている可能性があると考えられている¹⁾。

(2) 環境ホルモンに対する国内行政の取り組みの動向

国内では「奪われし未来」の刊行が環境ホルモンの話題に火を付けた。1960～1970年代に流産防止等の目的でジエチルスチルベステロール (DES) が医療面で多用された結果、胎児期に暴露された女性の生殖器に遅発性のがん等が発生したこと、DDE、PCBなどの汚染物質による動物の生殖率低下、個体数激減、雄の雌性化等が推測されること、などが指摘されている²⁾。

すでにEPA (米国環境保護局)、WWF (世界自然保護基金) が環境ホルモンとして数10の物質を指摘している。環境庁は1998年5月「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について」(環境ホルモン戦略計画SPEED'98)において、内分泌攪乱作用が疑われる物質の中から優先的に調査すべき物質として約70をリスト化した。さらに、1998年6月水環境保全のために300物質以上の化学物質を指定した。これらをもとに環境庁、建設省は1998年7月河川水などの環境汚染状況調査を開始した。

(3) 環境ホルモンの分析法

日本環境化学会は1998年7月に「環境ホルモンのモニタリング手法」(第24回日本環境化学会講演会資料集)、1998年10月に「水質、底質及び生物の内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の分析」(第26回日本環境化学会講演会予稿集)を示した。また、環境庁は1998年10月に「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)」を示した。これらの中では環境試料中から環境ホルモンを抽出・濃縮・精製する前処理行程、測定方法およびモニタリング目標検出下限値が示されている。ホルモンの血中濃度はng/ml～pg/mlと極めて低く、



図1. M-8000形LC/3DQMSの外観

その働きを阻害する環境ホルモンのモニタリング目標検出下限値も10pg/ml (河川水等)を目安とされている。標準測定方法としては、化合物によりガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を中心として、液体クロマトグラフ (LC) およびガスクロマトグラフ (GC) が示されている。また、環境調査も河川水を皮切りに底質、水生生物と広く行われる。試料の形態が多用のため、測定機器にかけるまでの試料前処理が重要なポイントである。

2. 日立の環境ホルモン分析への対応

(1) 分析装置の提供

日立では多岐にわたる環境ホルモンの分析に対応可能な分析装置をラインアップしている。測定対象と分析装置を表1に示す。

農薬、PCB、フェノール類、フタル酸エステル等はGC/MSによって測定される。M-7100A/M-7200A形GC/3DQMSはイオン検出部に三次元QMSを採用している。試料イオン量を増大させてのち検出できることから、試料1pgの検出が可能な高感度装置である。さらなる高感度、迅速な分析を目的として、G-7000M形高機能GCを搭載した装置を1999年1月に発売した。本装置では大量注入による高感度分析および新たな迅速簡易固相抽出法である固相マイクロ抽出 (SPME) を使った自動試料注入が可能である。

アミトール、メソミル、アルジカブル、カルバリルといっ

* (株)日立製作所 計測器事業部

** (株)日立サイエンスシステムズ テクノリサーチセンター

表 1. 測定対象と環境ホルモン分析装置

測定対象	分析装置	型式
農薬、PCB、フェノール類、 フタル酸エステル等	ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)	M-7100A/7200A形 GC/3DQMS
	液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)	M-8000形LC/3DQMS
農薬	液体クロマトグラフ (HPLC)	LaChrom シリーズ
	液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)	M-8000形LC/3DQMS
有機スズ	ガスクロマトグラフ (GC)	G-7000形GC
Pb, Cd, Hg等の重金属類	原子吸光光度計 (AA)	Z-5000形ZAA
	ICP発光分析装置 (ICP)	P-4010形ICP
	プラズマイオン源MS	P-6000形MIP-MS

た熱不安定性農薬についてはHPLCが指定されており、日立ではLa Chromシリーズにより対応する。分離すべき成分をカラムとの相互作用により保持時間の違いから分離したのち、ホトダイオードアレイ検出器を使った紫外部の三次元クロマトグラム、あるいは蛍光試薬によってラベル化した成分を蛍光検出器により検出する。通常室温付近で分析を行うため、熱に不安定な農薬などの物質の分析に真価を発揮する。今後、HPLCと質量分析計を結合した液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) が新たな環境ホルモン分析装置として期待されている。LC/MSでは、熱不安定な成分やGC/MSで誘導体化が必要な成分も誘導体化せずに分析できる利点を持つ。日立ではM-8000形LC/3DQMSによって対応する (図1に外観を示す)。イオン検出部に三次元QMSを搭載し、高感度な分析が可能である。さらに、大気圧イオン化法により広範囲な物質の測定が、MS/MS機能により優れた定性分析が可能である。農薬、アルキルフェノール等の分析に威力を発揮する。

有機スズについてはGCが指定されている。これらはまたGC/MSによる測定も同時に可とされている。高機能G-7000形GCは、分析試料をカラムに導入し分離すべき成分をカラムの温度条件およびカラムとの相互作用により保持時間の違いから分離する。次に、炎光光度計検出器 (P-FPD) により水素炎で試料を燃焼させ、その際炎光光度測定を行い干渉フィルタを通過した光をホトマルで検出する。試料を気化させてカラムに導入するため、熱に強い物質の分析に多用される。大量注入による高感度分析、SPEMを使った試料注入が可能である。

また、WWFではPb, Cdなどの重金属類が環境ホルモンとして疑われている。重金属類の分析装置として原子吸光光度計 (AA)、ICP発光分析装置、プラズマイオン源質量分析計をラインアップしている。

分析する測定対象として、河川水、底質生物試料の他食品、工業材料などがあり、多量の煩雑成分を含んでいる場合が多く、また分析目的物質の濃度が非常に低いことが考えられる。測定に際しては試料に応じた前処理が必要となる。日立では、この点についても積極的に取り組んでいる。(表2)

前処理の特徴を以下に簡単に述べる。

- ①固相による濃縮 (ディスク型固相)：大量試料 (1l~20l) を高流速 (200ml/min程度) で濃縮可能。溶出に使う有機溶媒も10ml程度と少量。

表 2. 試料の形態と主な前処理装置 (例)

試料の形態	前処理の種類	前処理装置
河川水などの水試料	固相抽出 (または、液液抽出)	・固相による濃縮 ・全自動固相抽出装置 ・カラムスイッチングによるオンライン固相抽出 ・固相マイクロ抽出 (SPEM)
底質	液液抽出	・高速溶媒抽出
生物試料	液液抽出	・高速溶媒抽出

- ②全自動固相抽出装置：試料の抽出、濃縮を全自動で行う。
- ③カラムスイッチングによるオンライン固相抽出：濃縮した目的成分の全量がカラムで注入でき、試料量が従来の1/100で済む。オンラインのため、煩雑な前処理操作が不要。
- ④SPEM：有機溶媒が不要。操作が簡単。
- ⑤高速溶媒抽出：溶媒試料量が15~40mlと少ない、抽出時間が12~18minと従来法の1/10以下で済む。
- ⑥大量注入法：100 μ lの大量注入により、高感度分析が可能。

(2) 分析ソフト (アプリケーション) の提供

日立では上記分析装置、前処理装置により信頼性の高いデータの提供を目指している。1998年10月、環境ホルモン分析デモコーナを設置した。前処理を含めたトータルソリューションを顧客へ提供したいと考える。これらの装置による分析データを随時発行しており、すでに3版を数えた。

また、1998年11月より環境ホルモンセミナーを全国展開し、顧客への装置紹介、分析ソフトの浸透を行っている。

各種展示会 [(分析機器展 (1998年9月)、全日本科学機器展 (1998年10月))] においても、環境ホルモンコーナーを設け、装置紹介、情報提供を行なっている。

(3) 顧客の相談窓口ー環境ホルモンアンサーセンターの開設

顧客の疑問に答え、知識を提供することを目的に、1998年6月に環境ホルモンアンサーセンターを開設した。顧客よりE-mail(a_center@cm.naka.hitachi.co.jp) またはFAX (029-272-2175) で質問を受け、回答するものである。また、インターネット上のホームページに環境ホルモン分析 (<http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki/>) を設けた。さらに、ユーザールームのインターネットセミナーに環境

ホルモンの最新情報を掲示し顧客への情報の提供に役立っている。

3. おわりに

環境ホルモンの研究は世界的にもまだ緒についたばかりである。特にその毒性を評価するには多くの研究、検討を待たねばならない。しかし、われわれは分析技術を通じて、環境ホルモン問題の解決に貢献したい。日立としては今後以下の課題に取り組む。

(1) 環境ホルモン研究に貢献する優れた分析装置、アプリケーション－高感度、高信頼性を有する－の開発と提供

(2) 顧客、研究者との相互通信を通じての環境ホルモン研究、装置開発の促進

(3) 顧客が気軽に相談、接触できる窓口、体制づくり

参考文献

- 1) 環境庁：「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED'98－」(1998年5月)
- 2) シーア・コルボーンほか（翔詠社）：「奪われし未来」(1997年9月)

新製品紹介

日立走査電子顕微鏡 S-4300

このたびご好評をいただいておりますS-4200形走査電子顕微鏡の後継機として、S-4300形走査電子顕微鏡（SEM）を発売しました。

S-4300形は、高分解能観察を特長とする電界放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM）で、操作性および機能を大幅に向上させたPC（パーソナルコンピュータ）制御によるSEMです。

S-4200形の本体性能を継承し、操作系はPC-SEMとして好評のS-4700形、S-3500形と共通の操作性を有しているとともに、SEM画像データをPCの利用により、電子データとして保存・管理します。

新しいニーズにマッチしたPC-FE-SEM S-4300形は、SEMのビギナーから熟練者まで、幅広い分野で信頼されるルーチンワーク機として活躍できる装置です。

■ 主な特長

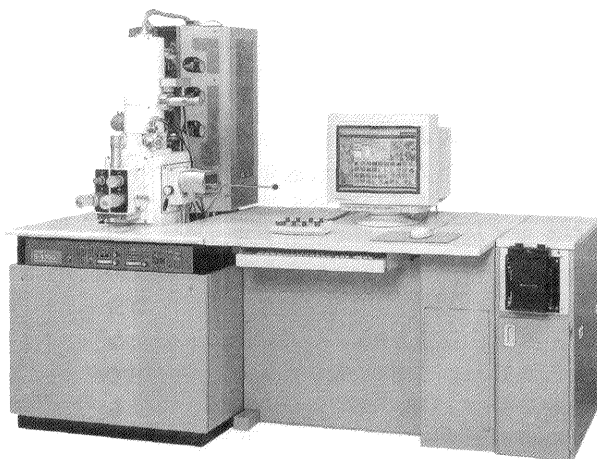
(1) 操作性の向上

Windows環境のもと、SEMとしての操作性を追求した画像／操作一体形のマウスオペレーションとFE-SEMとしては初の日本語メニュー表示により、OA感覚の操作を実現しました。さらに、従来の操作に慣れた方のために専用ロータリーノブを用意、微妙な調整操作が手動で行えます。

(2) 超高精細画像メモリ

2560×1920画素の超高精細画像メモリを搭載することにより、生（アナ

図1. S-4300形走査電子顕微鏡の外観



ログ）の撮影写真に遜色のない画質のメモリ画像データがPCで保存でき、かつ再生写真が得られます。

(3) SEM像のデータファイリング

SEM画像は、PCのハードディスクにBMPフォーマットのファイルとして保存することができます。多数の画像データのファイリングに対しては、標準搭載のイメージマネージャー機能により、データの整理、検索が容易です。また、BMPファイルもTIFF、JPEGファイルにも変換可能で、市販の画像処理ソフト等にも幅広く対応しています。

(4) X線分析装置（EDX）とのシステム化

EDXとのシステム化に対しては、キーボード／マウス共用機能（Hi-Mouse機能）を利用することにより、1つのマウスとキーボードで、SEMとEDXの操作が可能となります。PC同士をネットワーク（Ethernet）接続することにより、MO（光磁気ディスク）やプリンタをSEMとEDXから共有することが可能です。電子光学系にX線分析用モード（ANALYSISモード）を採用することにより、従来のようにカラムに手を触れることなく、EDX分析に必要な大電流を得られるように

なりました。

(5) 高分解能観察

信頼性の高いFE電子銃と電子レンズにより、実用加速電圧15kVの分解能値1.5nmを保証しており、手軽に高分解能像が得られます。（低加速電圧1kVの分解能は5.0nm保証）

(6) メンテナンスの簡便さ

定期的クリーニングが必要な対物可動絞りも、加熱タイプを用いることにより、加熱無しのタイプと比較して、メンテナンス間隔を約5倍長くしてあります。

実績のある超高真空技術により、1日間程度の停電に対しても、電源再投入で、すぐに通常通り、使い始められるほど完成されています。

■ 主な仕様

- ・ 分解能：1.5nm（加速電圧15kV時）
- ・ 倍率：×20～×500,000
- ・ 加速電圧：0.5～30kV
- ・ 操作コンピュータ：Windows*・PC
- ・ 観察モニタ：17"または21"カラーモニタ
- ・ 画像メモリ：2560×1920画素（最大）
- ・ 画像ファイリング：SEM画像専用ソフト搭載

* 米国Microsoft Corp.の登録商標です。

OSDA-2000形 ウェーハ結晶欠陥解析装置の紹介

Introduction of Optical Shallow Defect Analyzer

松井 繁* 武田一男**

1. はじめに

DRAMやマイクロプロセッサなどに代表されるシリコンデバイスでは、高集積度化・微細化が急速に進行している。製造ラインにおけるこれらシリコンデバイスの歩留まりを左右する不良要因として、これまではパターン寸法や膜厚などの加工不良、クリーンルーム内や製造装置内で発生する塵埃の付着など、製造プロセスに起因する不良が大きな割合を占めていた。ところが高集積度化・微細化の進行につれて、最近シリコンウェーハそのものに起因したデバイス不良が多発するようになってきた。

シリコンウェーハには一般に、シリコン単結晶育成中に発生するGrown-in欠陥と呼ばれる結晶欠陥をはじめ種々の微小欠陥が含まれている（図1参照）。シリコンウェーハの表層付近にこれらの欠陥が存在すると、ゲート酸化膜の絶縁破壊、p-n接合リーク電流の増大、素子分離不良など種々の障害の原因となり、デバイス製造の歩留まりを低下させることがわかってきた。そのため、シリコンウェーハの表面上だけでなく、デバイスの電氣的動作に関わる浅い内部領域の結晶欠陥を評価する技術が必要になってきた。

2. OSDA-2000の特長

ウェーハ表面上を測定する異物検査装置の場合と異なり、内部の結晶欠陥分布を測定する場合には深さ情報を得ることが不可欠である。また、結晶欠陥の大きさは熱処理などによって増大することがあり、上流の工程でこれらを捕まえるためには十分に高い感度を備えていることも不可欠である。OSDA-2000（図2参照）はデバイス特性に悪影響をおよぼす微小結晶欠陥のウェーハ面内位置、深さ、大きさを、レーザー光を用いて非破壊・高感度で測定することができ、次のような特長をもつ。

- (1) 深さ約0.5 μm までの浅い領域の結晶欠陥を選択的に検出可能。

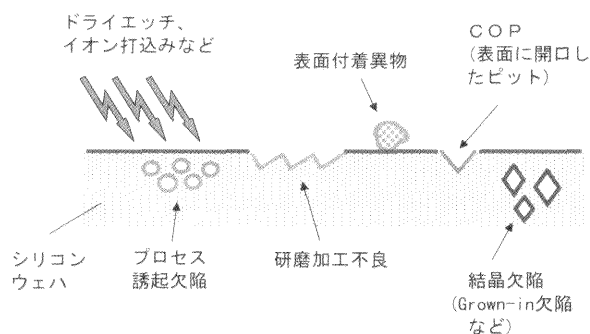


図1. 種々の微小欠陥

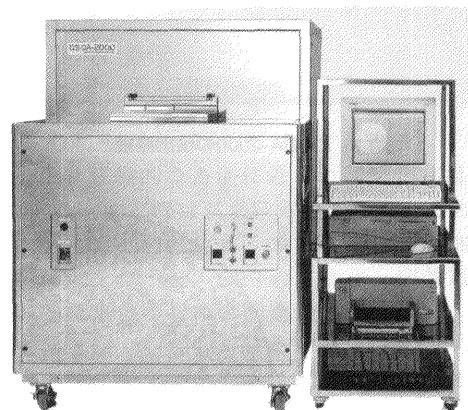


図2. OSDA-2000外観

- (2) 検出した各欠陥について深さと大きさを同時に算出。
(3) 表面に付着させた標準ポリスチレン粒子直径換算で最小0.05 μm を検出可能な高い感度をもつ。

OSDA-2000の主な仕様を表1に示す。

3. OSDA-2000の測定原理

シリコンウェーハは肉眼では金属光沢があり不透明に見えるが、可視光領域の波長においても光はある程度の深さまで浸入することができる。この際、波長が短いほど吸収による減衰が大きいため、光は浅い領域までしか到達しない。このことを利用して、OSDA-2000では図3に示すようにシリコンウェーハの表面に長短2波長(532nmと810nm)のレーザー光を照射する。シリコンウェーハ中に微小欠陥が存在するとこれら2波長のレーザー光は散乱され、それぞれの散乱光が2つの検出器で検出される。短い532nmの散乱光強度は欠陥の大きさと深さの両方に影響されるが、長い810nmの散乱光強度は吸収係数が小さいため浅い領域では減衰を無視することができ、ほぼ欠陥の大きさだけに影響される。このため、2波長の散乱光強度を比較することにより、欠陥の大きさと深さを同時に求めることができる。また、OSDA-2000では図4に示すように、

表1. OSDA-2000の主な仕様

欠陥サイズ検出限界	min 0.05 μm (標準ポリスチレン粒子換算)
欠陥検出可能深さ	max 5 μm
深さ判定可能範囲	0~0.5 μm
深さ分解能	$\pm 0.1 \mu\text{m}$
スループット	約30分/8インチウェーハ (サンプリング: 25%時)
対応ウェーハサイズ	8インチ/6インチ (300mm対応計画中)
表面付着異物の識別	結晶起因欠陥と識別可能 (オプション)

* (株)日立製作所 計測器事業部

** (株)日立製作所 中央研究所

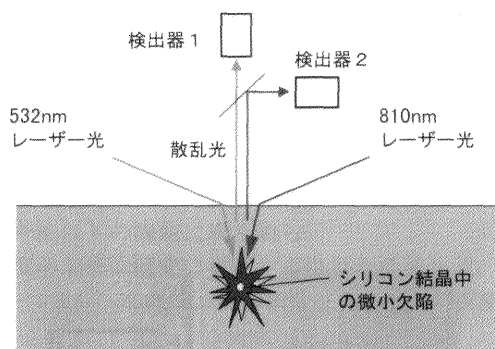


図3. OSDA-2000の検出原理

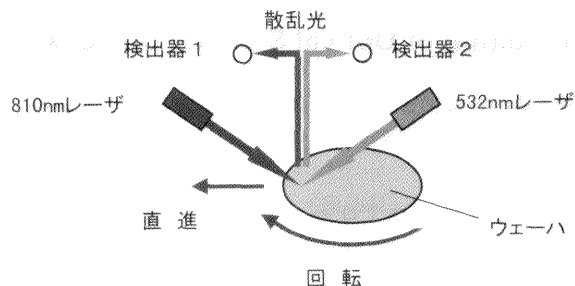
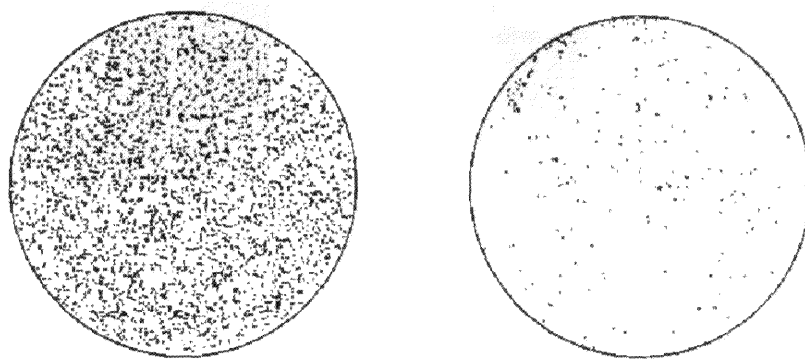


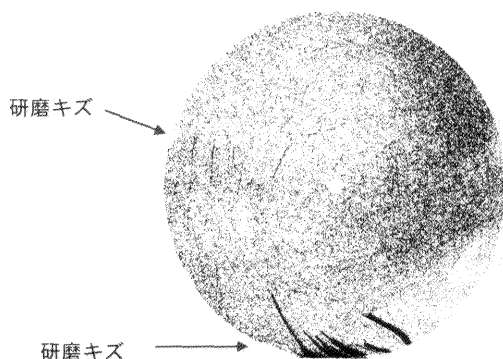
図4. OSDA-2000の走査方法



CZウェーハ

エピウェーハ

A. CZウェーハとエピウェーハの測定例



B. 研磨加工不良の測定例

図5. OSDA-2000による測定例

これらのレーザー光を非常に小さいスポット状に集光してウェーハ表面に照射し、ウェーハ自身を回転と直進の組合せで移動させることによってウェーハ全面をらせん状に走査する。

4. 応用分野と測定例

OSDA-2000の応用分野は、ウェーハ製造メーカーとデバイス製造メーカーに2分される。ウェーハ製造メーカーにおいては、ウェーハの出荷検査や結晶育成条件の最適化、およびエピタキシャル・ウェーハなど次世代のウェーハの開発評価に適用することができる。また、デバイス製造メーカーにおいては、ウェーハの受入検査のほか、主として熱処理・酸化・イオン打ち込み・ドライエッチング

などのプロセスにおける結晶欠陥の挙動変化（生成、増大、消滅など）の評価に適用することができる。

図5に種々の測定例を示す。

5. おわりに

現在、OSDA-2000で検出した欠陥が実際にどのような結晶欠陥なのかをTEM観察によって確認する作業を進めている。特にエピタキシャルウェーハ中の結晶欠陥など、従来実体がよく分かっていなかった欠陥の正体に迫ることをねらっている。

参考文献

1. 武田一男：応用物理 65.1162 (1996)。

液体クロマトグラム分離の最適化支援ソフトクロムソード

Software for supporting optimization of separation condition in liquid chromatography (ChromSword®)

出口 喜三郎*

S.V.Galushko**

1. はじめに

クロマトグラム分離の最適化とは、“すべてのピークを最少時間で、十分な分離度で分離するための条件を探索すること”と定義される。ところで、“最適な分離条件の探索が、もっと簡単に、効率よくできたら”とは、クロマトグラフィーに携わる人達の共通した願望ではないだろうか。もし、数成分が混ざったサンプルの最適分離条件を探索する必要に迫られた場合、私たちは、通常、以下の手順で行なっている。

ステップ1：まず、同じ成分を分離した例（クロマトグラム）があるか調べる。つまりデータベースの検索である。もし、ぴったりそのものが見つければ良いが、そうでない場合は、類似成分のデータを参考にしながらクロマトグラフィーの分離モード（逆相、順相、イオン交換、等）の選択、HPLC装置構成（グラジエント／イソクラテック溶出、カラム、UV吸光度／屈折率／蛍光／電気化学等の検出器）を決めて次のステップに進む。

ステップ2：データベースで得られた情報をもとにHPLCを構築し、溶離液を準備したら、試行実験を開始する。この試行実験の仕方は、各人各様である。つまり、一成分毎に溶離液の組成を変えながら、その溶出挙動（保持時間）を調べる“慎重派”。また、いきなり混合成分の分離を試みる“直感派”（経験豊富なエキスパート）。いずれにしろ、最適分離条件に到達するまでの試行実験回数は、各人の経験と試行実験の仕方に大きく依存し、しばしば多大の時間を要する。また、一般に、“分離の最適化”とは、このステップ2を意味する。

この多大の時間を要する“分離の最適化”（ステップ2）を、コンピュータの助けを借りて、もっと効率的に、また、自動的に行なおうとする試みは、約25年前に溯る。これまでに、多くの方法が提案され、また製品化もされてきたが、これらは以下の3つに大別できる（参考文献1を参照）。

(1) 溶出パラメータ（有機溶媒濃度、pH、イオン濃度、等）毎に、各成分の溶出挙動（保持時間）をプロットし、カーブフィテングした後、最適なパラメータ値を決めるシミュレーション法。

(2) シンプレックス法 (Simplex) に基づいて、分離度マップやクロマトグラム応答関数の最適値（最小値）を求める方法。

(3) 知識データベースに基づくエキスパートシステム（これは、むしろステップ1に対応する方法）。

最初、より経験的な方法に近く、理解が容易な(1)の方法（Window法と呼ばれた）が提案され、その後、完全な自動化を目的とした数多くの(2)の方法が開発され製品化もされた。しかし、(2)の方法は、応答関数の任意性、非線型最適化の収束の問題があり、現在、あまり使用されていない。むしろ、分かりやすい(1)の方法に対応する製品である“ドライラボ (DryLabo)”や、これを更に発展させた“クロムソード (ChromSword®)”が普及しつつある。また、(1)と(2)の方法をミックスした使用方法も提案されている。本解説では、最新の分離の最適化支援ソフト“クロムソード”について紹介する。

2. クロムソード (ChromSword®) とその特長

Snyder等によって開発された“ドライラボ (DryLabo)”では、溶出パラメータを変更しながら、先ず、2回の試行実験データを取る必要がある。その後、各成分の保持時間をカーブフィテングし、シミュレーションクロマトグラムから最適パラメータを決める。“クロムソード (ChromSword®)”も、方法論的には同じだが、逆相クロマトグラフィーでは、試行実験データ無しでも、ある程度の保持時間予測（ここでは、“0次予測”と呼ぶ）を可能にする点が異なる。“どうして0次予測が可能なのか”を、まず、簡単に説明したい。

逆相クロマトグラフィーでの保持挙動は、一般に、疎水性相互作用理論に基づいて説明される。図1は、そのモデルを模式的に示したものである。

溶質分子は、移動相においては溶媒分子で溶媒和されている（キャビティ効果と呼ばれている）。溶媒和エネルギーは、このキャビティ自身の安定化と溶質分子の安定化で決まる。固定相への吸着も、固定相は溶媒分子を表面に吸着したものとするならば、同様に取り扱える。この時、溶質分子の保持挙動（キャパシティブファクター k' ）は、つぎの近似式で表わせる²⁾。

$$\ln k' = aV^{2/3} + b \Delta G_{es} + c$$

a ：移動相(m)・固定相(s)間の表面張力差 ($\gamma_s - \gamma_m$)

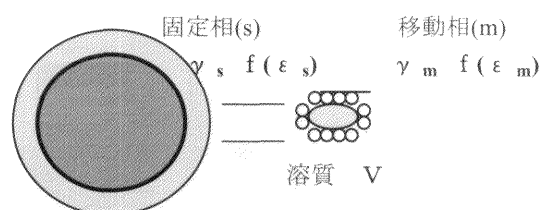
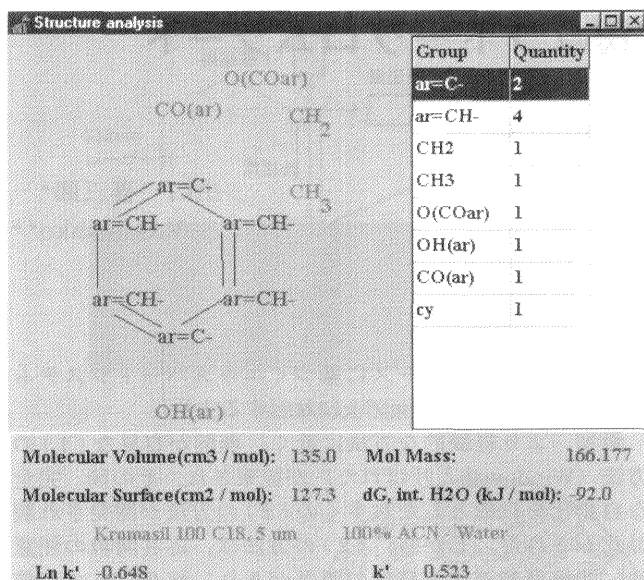


図1 逆相クロマトグラフィーにおける疎水性相互作用モデル

* (株)日立サイエンスシステムズ テクノリサーチセンター

** ウクライナ科学アカデミー 生化学&石油化学研究所 教授

図2 入力された分子構造式からVおよびΔG_sの計算

V: 溶質の分子容積

b ΔG_s: 移動相・固定相間での双極子-双極子相互作用差:

$$b \Delta G_s = [f(\epsilon_s) - f(\epsilon_m)] \sum_j \mu_j^2 / a_j$$

$$f(\epsilon) = (\epsilon - 1) / (2\epsilon + 1)$$

ε: 誘電率, μ_j: 分子内結合間の双極子, a_j: Van der Waals 半径

第1項は、キャビティ自身の安定化に相当するものであり、溶質分子の表面積がキャビティの大きさを決めている。第2項は、キャビティ内の溶質分子の安定化に対応するもので、上式では、双極子-双極子相互作用で近似されている。第3項(c)は移動相と固定相の容積比に対応する定数である。

ここで、溶質の分子容積V、双極子-双極子相互作用ΔG_sは、溶質分子固有のものであり、一方、(a, b, c)は、カラムと移動相の溶媒によって求められるものである。従って、もし、分子構造式が既知であるならば、構造式を入力すると(入力のためのソフト"クロムドロー(ChromDraw®)"が、標準装備されている)、分子容積V

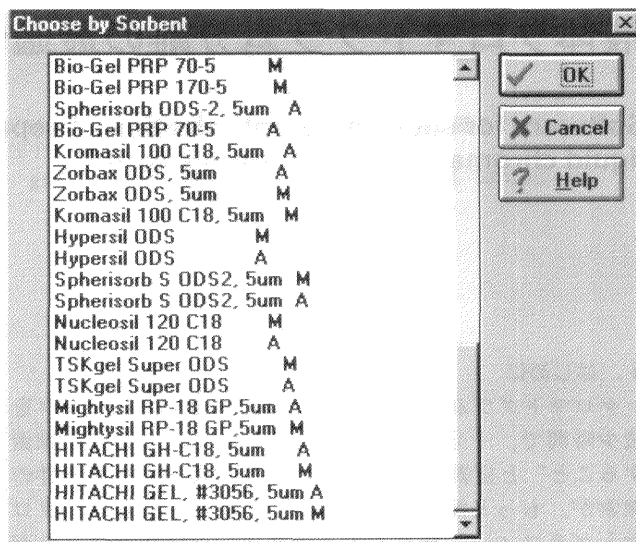


図3 クロムソードのカラムデータベース

および双極子-双極子相互作用ΔG_sは、近似的に計算される(図2参照)。また、(a, b, c)の近似計算は可能であるが、クロムソードでは、典型的な5成分(Benzene, Chlorobenzene, Phenol, Toluene, p-Hydroxybenzaldehyde)の溶出挙動から決定し、カラムデータベース内に保存している。現在、23種のカラムの特性が、メタノール(M)、アセトニトリル(A)、テトラヒドロフラン(T)に対して、詳細に調べられ、データベースに保存されている。図3は、その一部である。

"0次予測"は、必ずしも正確な予測をする訳ではないが、試行実験データを取る前にどのあたりに溶出するか(保持時間)を知るのに役に立つ。つまり、無駄な試行実験を防ぐことになる。また、1(2)回の試行実験データを元に、分子容積Vおよび双極子-双極子相互作用ΔG_sを計算し直すことが可能であり(1(2)次保持予測と呼ぶ)、予測の正確さは一層向上する。広範な分子で保持予測の正確さを調べた結果、次のように結論づけされている。

0次保持時間予測の正確さ: ± 10 - 30%

1次保持時間予測の正確さ: ± 5 - 15%

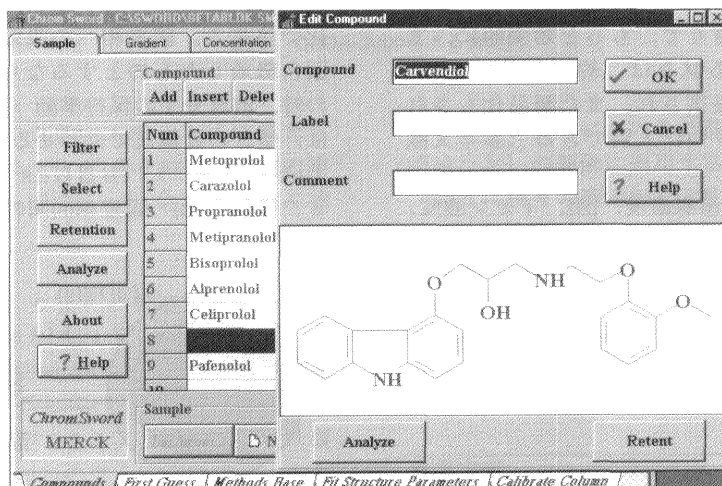


図4 各成分の分子構造式の入力

2次保持時間予測の正確さ：+/- 1〜3%

逆相系以外の順相，イオン交換クロマトグラフィでは，このような分子構造式に基づく保持予測はできない。この場合は，各溶出パラメーター（例えば，有機溶媒濃度，イオン濃度，pH等）に対して2〜3回の試行実験データを取った後，各成分の保持時間をカーブフィテングし，クロマトグラムのシミュレーションから最適パラメータを決定することができる。

3. 応用例ーベータブロッカー（9成分）の最適分離

クロムソードの1つの応用例として，ベータブロッカー9成分の分離の最適化の手順を，以下に記述する。

（1）まず，0次予測のための各成分名およびその分子構造式を，クロムドローを用いて入力する。図4は，Carvendiolの入力例である。

（2）入力された分子構造式とデータベースから，0次予測が可能となる。図5はカラム“LiChroCART® Purospher

RP18e”，メタノール60%で分離した場合のシミュレーションクロマトグラムである。CarvendiolとBisoprololが重なり，全体のクロマトグラム溶出時間も長い。

（3）1回目の試行実験を以下の条件で行う：

カラム：LiChroCART® Purospher RP18e (250x4).

溶離液：60% MeOH -50mM phosphate buffer; pH=3.00.

温度：30℃.

図6はこの試行実験で得られた保持時間を用いて，双極子-双極子相互作用

ΔG_s再計算した後のシミュレーションクロマトグラム（メタノール58%での）である。

（4）2回目の試行実験を以下の条件で行う：

カラム：LiChroCART® Purospher RP18e (250x4).

溶離液：50% MeOH；50mM phosphate buffer; pH=3.00 .

温度：30℃.

図7は1，2回での試行実験で得られた保持時間を用いて，

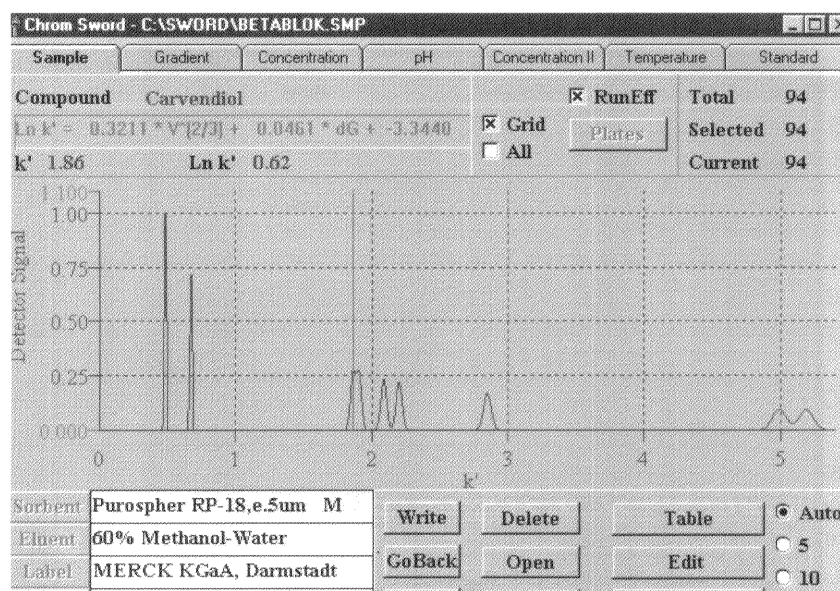


図5 0次予測のシミュレーションクロマトグラム

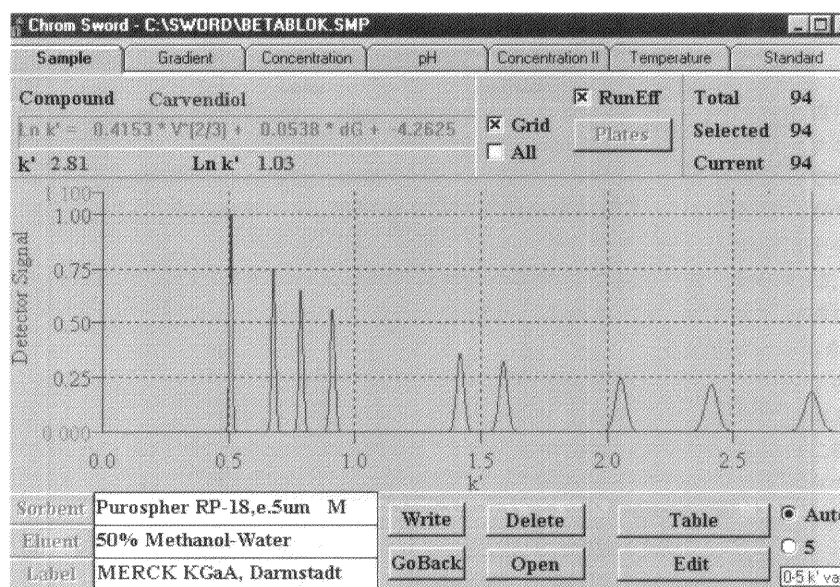


図6 1回目の試行実験データで補正されたシミュレーションクロマトグラム

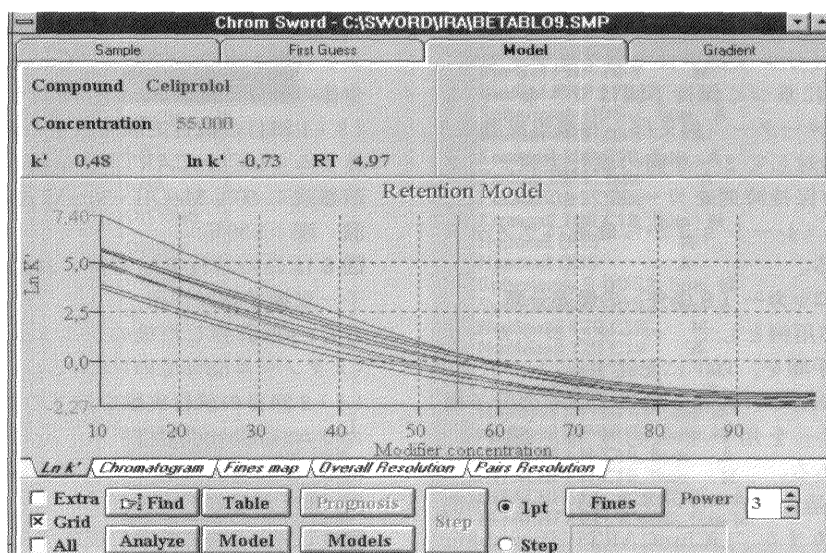


図 7 1、2 回の試行実験データで再計算された保持予測カーブ

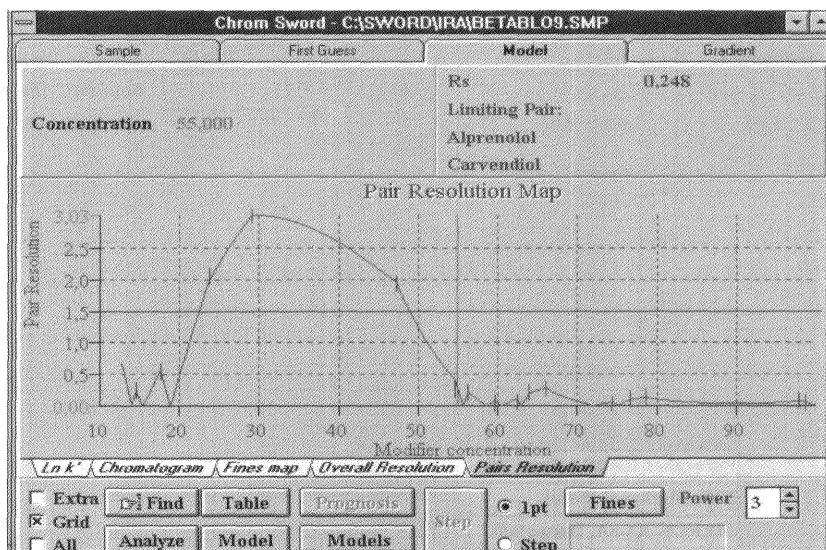


図 8 ヘア分離度マップ (Pair Resolution Map)

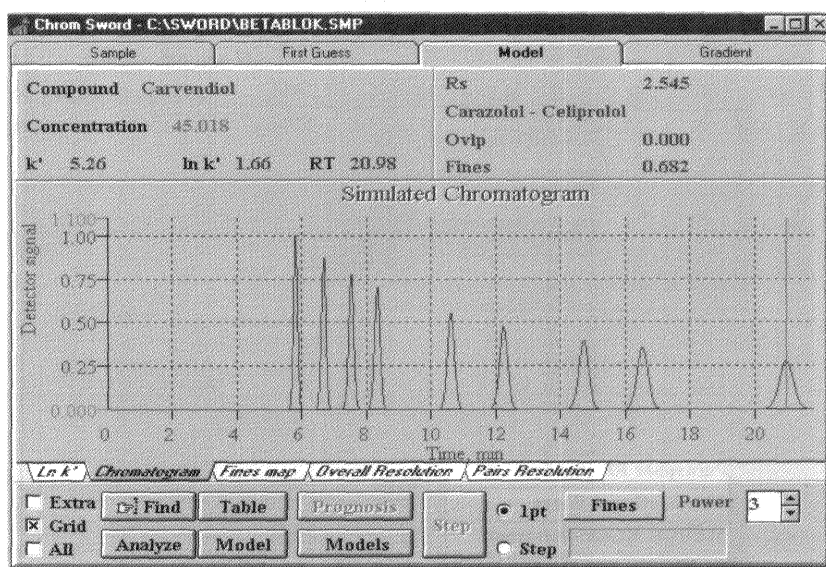


図 9 最適分離条件でのシミュレーションクロマトグラム

Column: Purospher RP18c, 250x4
 Organic modifier: Methanol, 45%.
 Water Component: 50mM phosphate buffer, pH=3.0;
 Isocratic elution.
 Temperature: 30°C
 Flow rate: 0.5 ml/min.
 Analysis time: 22-25 min.

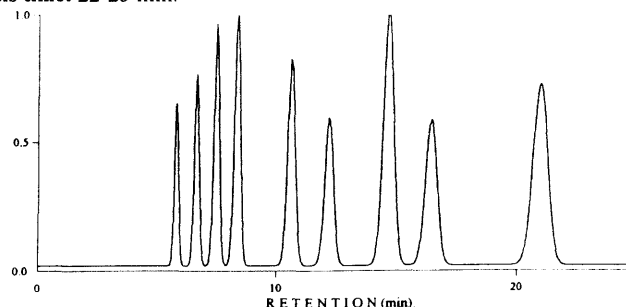


図10 最適分離条件と実際に得られたクロマトグラム

双極子-双極子相互

作用 ΔG_{es} および分子容量 V を再計算した後の保持時間 (キャパシティブファクター) 予測カーブである。

(5) 図8は、最も分離度の悪いピークペアをプロットした“ペア分離度マップ (Pair-Resolution Map)”と呼ばれているものである。この図より、メタノール濃度23%—48%の間では、すべてのピークの分離度が $R_s = 1.5$ 以上であることが分かる。最適化の条件の一つである“最小時間”での分離を考えると、メタノール濃度45%付近が最適な分離条件といえるだろう。図9, 10は、この最適条件でのシミュレーションクロマトグラムと実際に得られたクロマトグラムである。かなり良く一致しているといえる。

4. まとめ

液体クロマトグラム分離の最適化の方法とその一つであるクロムソード (ChromSword®) およびその応用例について述べた。最後に強調したい点は、最適化支援ソフトの目的は、スタートボタンを押すだけで自動的に最適

条件を探索するものでなく、その名が示すとうり、あくまでも探索を“支援 (Computer-Assisted)”することにある。例えば、今まで10回の試行実験を要していた人が、最適化支援ソフトを使用することにより、5回で最適な分離条件を見出すことができたとするならば、大いに省力化に寄与したといえるだろう。また、経験豊富な人でも、もし5回の試行実験を3回に減らせたとしたら、それなりに効果があった言うべきだろう。しかし将来的には、可能な限りの“自動化”をはかることは言うまでもなく、既にそのような試みが行われつつある。

参考文献

- 1) J. L. Glajch and L. R. Snyder, Computer-Assisted Method Development for High Performance Liquid Chromatography (Elsevier Science, New York, 1990)
- 2) S. V. Galushko, J. Chromatography, 552 (1991) 91.
- 3) S. V. Galushko, A. A. Kamenchuk, and G. L. Pit, International Laboratory, May, 1995, 14C.

Topics

日本分析化学会 第47年会開催さる

日本分析化学会第47年会が10月6日から8日までの3日間、岐阜大学柳戸キャンパスで開催された。参加登録者は約1,500人に上り、750件の研究成果が

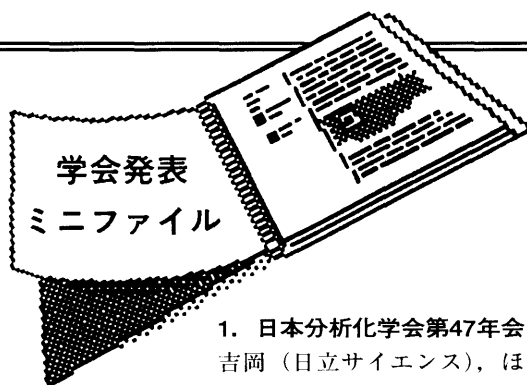
発表され、熱心な討論が行われた。

公開シンポジウムでは「近未来環境変動予測と分析化学の役割」と題し、環境ホルモン、酸性雨、オゾンホール、海洋環境の保全をテーマにパネルディスカッションが行われ、今後の分析化学の係わりについて参加者が共に考えるよい機会となった。

一般講演で日立からは、環境汚染物質のGC/MS分析、LC/MSによる貝毒の分析、原子吸光による食品中のSe分析等計8件の発表をし、多くの研究者

との討論を通じた交流が行われた。また、特別セッションの「分析信頼性と標準物質」では国内外の動向および原子吸光環境分析不確かさに関し、2件の依頼講演を受け持った。恒例の功労者の表彰では、岡野寛日立計測器サービス代表取締役が技術功労賞を受賞したほか、6名が有効賞を受賞し、分析化学への永年の貢献を認められた。

次年度の第48年会は、平成11年9月8日から10日に神戸市の甲南大学での開催が予定されている。



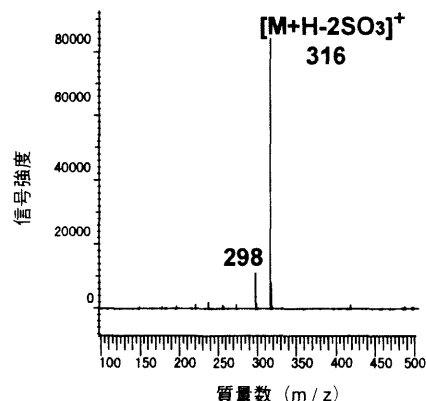
内野興一（株式会社日立サイエンスシステムズ）

1. 日本分析化学会第47年会（1998.10/6～8，岐阜大学）

吉岡（日立サイエンス），ほか：麻痺性貝毒の高精度・高感度分析の開発

高電圧も熱も使わない新イオン化法として注目されているソニックスプレイイオン化法LC/MSを用いて麻痺性貝毒の分析を試みた。最も不安定とされるPX1も良好な正・負両イオン質量スペクトルが得られ，対象となる約20種類の化合物すべてに本イオン化法が適用可能であることを実証した。

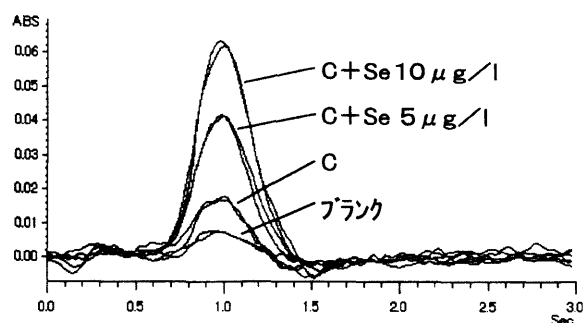
図1 貝毒(PX1)のマススペクトル (SSI正イオン化モード)



山本（日立サイエンス），ほか：電気加熱炉用いた食品中のSe分析における化学修飾剤の効果

セレンを分析する際のリンによる干渉の抑制には無機・有機混合系化学修飾剤が効果的である。各種経腸栄養剤中 $\mu\text{g/l}$ オーダーのセレン分析に適用し，好結果を得た。また，干渉抑制のメカニズムを調べるため，炉内生成物のSEM観察を行った。

図2 セレンの原子吸光プロファイル



鍋島（日立・中央研究所），ほか：ICPおよびMIPを用いたプラズマイオン源3DQ/MS装置

高田（日立・中央研究所），ほか：プラズマイオン化三次元四重極質量分析計の基本特性

谷川（日立・計測器事業部），ほか：環境汚染物質の高感度測定

保田（日立・計測器事業部），ほか：分析の信頼性と分析所認定をめぐる国内外の動き

内野（日立サイエンス），ほか：環境分析における測定値のUncertainty

2. イオンクロマトグラフィー国際シンポジウム（1998.9/28～10/1，大阪）

甲田（日立サイエンス），ほか：Simultaneous Separation of Anions and Cations by Flow Gradient Ion Chromatography

図に示すような流路を採って，陽および陰イオン分離カラム内の溶離液の流速を別個に設定する事により，両イオンの一斉分析を可能にした。数 mg/l オーダーのリチウム，塩素，硝酸等8種類のイオンが約11分で測定でき，再現性も良好であった。

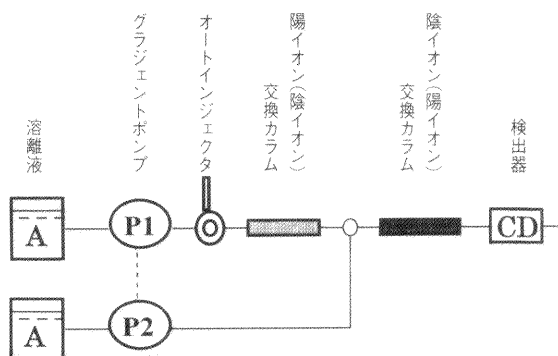


図3 測定システムの流路系統図

3. 第14回分析電子顕微鏡討論会（9/9～10，工学院大学）

今野（日立サイエンス），ほか：ピンポイント分析の実際

疑似欠陥（イオンビーム照射後，Wデポジットを人為的に形成した64M-DRAMのピンポイント観察と分析を試みた。断面TEM試料作製には，高加速SEM像観察とFIB加工を繰り返して行い，構造を確認しながら目的面まで薄膜化して行くシステムを用いた。図はそのTEM像であり，欠陥最先端部が正確に確認された。

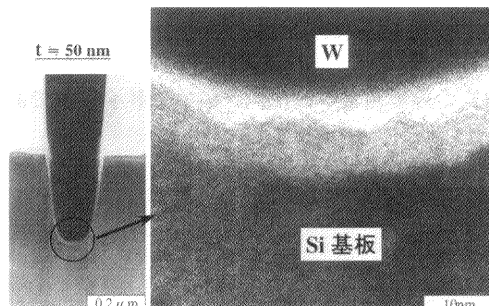


図4 疑似欠陥部のTEM像

木本（日立・中央研究所），ほか：FE-TEMによる元素分布像観察のための画像処理

岡田（日立・中央研究所），ほか：FEG-TEM/EDS分析時のSUS316L銅薄膜中における分析ビームの拡がりの研究

4. 第125回液体クロマトグラフィー研究懇談会（1998.6/30，東京理科大学）

岩淵（日立サイエンス），ほか：アミノ酸分析におけるOPAプレラベル誘導体化の検討

プレラベル誘導体化法は迅速性，経済性等で多くの利点を有するが，プロリン（Pro）を含めたアミノ酸18成分の一斉分析が課題の一つとなっていた。内部標準物質としてグルコサミン酸（Glc）を用い，反応試薬に次亜塩素酸ナトリウムを加えることにより一斉分析を可能にした。

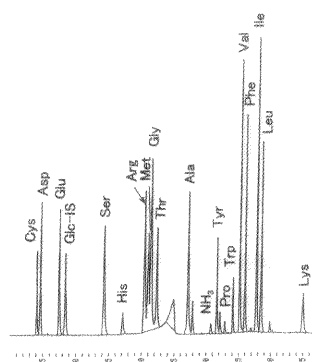


図5 アミノ酸標準混合液のクロマトグラム

5. 国際電子顕微鏡学会 [ICEM-14]（1998.9/1～5，メキシコ）

多持（日立サイエンス），ほか：High Position Accuracy TEM Specimen Preparation Using a FIB-TEM Compatible System

多持（日立サイエンス），ほか：A Study for Direct Observation of Liposomes Oligolamellar

6. 米国電子顕微鏡学会（1998.7/13～16，アトランタ）

上野（日立サイエンス），ほか：A New Method for Pin Point Failure Analysis Using FIB/TEM System

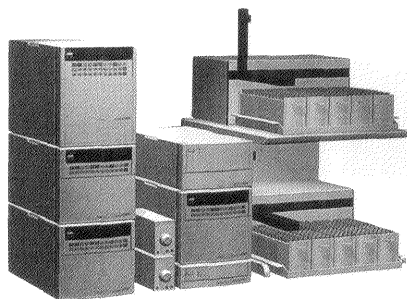
新製品紹介

日立コンビケム用 高速精製システム(HTPA)

日立コンビケム用高速精製システム(HTPA)は、新薬開発において効率よく合成物の精製・確認を行うシステムです。このHTPAには高速LC分取システムと、マススペクトロメータを接続したLC/MS合成確認システムがあります。

特長

1. 高スループットで192試料を連続精製可能
2. 分子量による合成物質の確認可能



HTPAの高速LC分取システム外観

3. クロマトグラム・マスデータの一括管理
 4. イージーオペレーション
 5. 試料保管に便利なマイクロプレート対応
- (発表時期：1998年9月)

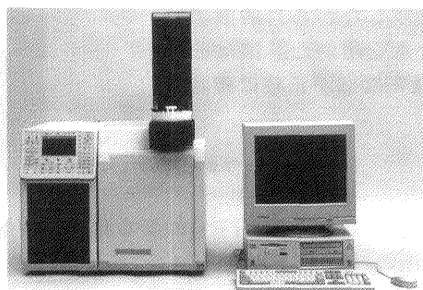
環境分野向け 高機能ガスクロ G-7000形の紹介

環境分野における測定対象物を迅速かつ効率よく分析を行うために開発された高機能ガスクロマトグラフG-7000を紹介します。

環境分野の分析においては試料の前処理工程の煩雑さをいかに軽減させるかが重要なポイントであり、G-7000で

は最新の固相マイクロ抽出SPME技術を搭載し、水中の残留農薬などを効率良く抽出可能・分析可能なシステムになっています。また、サンプルの大容量注入が可能でことや熱に不安定なサンプルもPTV(Programmable Temperature Vaporize)機能の標準搭載により安定した測定が可能であるなど、多彩な分析が可能になっています。環境以外の分野でも幅広くご使用いただけます。

また、G-7000のデータ処理装置として、HPLCで好評をいただいているD-7000形HPLCマネージャと操作性を統一したD-7000GC形PCインテグレータを発売しました。D-7000GCは、D-7000のサンプリングタイムを高速化し、キャピラリーガスクロに対応できるようにしたものです。



高機能ガスクロG-7000形の外観

日製産業株式会社

北海道支店 電話 札幌 (011) 221-7241
東北支店 電話 仙台 (022) 264-2211
筑波支店 電話 土浦 (0298) 23-7391
関西支店 電話 大阪 (06) 366-2551

本社 電話 東京 (03) 3504-7211
横浜支店 電話 横浜 (045) 451-5151
新潟営業所 電話 新潟 (025) 241-3011
北陸営業所 電話 金沢 (076) 263-3480
中部支店 電話 名古屋(052) 583-5841

京都営業所 電話 京都 (075) 241-1591
四国営業所 電話 高松 (0878) 62-3391
中国支店 電話 広島 (082) 221-4514
九州支店 電話 福岡 (092) 721-3501

〈編集後記〉

最近の世の中は物騒である。砒素や青酸カリとか毒物を混入させる事件が多発し、食品中に異物が混入されたりする話が数多く報道されている。このような事件が起こると世間の人々から分析機器メーカーに対して毒物をさっと見分ける装置はないのか、製造出来ないのかと言う質問が多く出る。確かにあれば便利だし、作れば売れるでしょう。砒素を測定して欲しい又は青酸カリを測定して欲しいと言う要求にはなんとか応えられるが、何が入っているか調べて欲しいと言う要求に応ずるのは非常に難しい。分析法は有機物、無機物によっても異なり、固体、液体でも異なる。これらを何かする為の新しい原理・原則を見い出すにはまだまだ時間が必要と思う。所沢のダイオキシン騒動にも見られるように分析結果が大きな影響力を持っている。しかし巻頭言で戸田先生が言われているようにその精度、再現性については充分配慮する必要があるし、さらにサンプル

の前処理法の改良も同時に進行させなければならぬだろう。この機会に化学分析の必要性や重要性を社会が正しく認識してくれることを強く望みたい。

■インターネットホームページ

○(株)日立製作所計測器事業部
<http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki>

○日製産業(株)
<http://www.nisseisg.co.jp>

■本ニュースに関するお問い合わせは、下記、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○日立計測エンジニアリング株式会社
テクノロジーサーチセンター

〒312-0033 茨城県ひたちなか市毛882番地
電話 ひたちなか
(029) 273-2111(代)

○日製産業株式会社
科学システム販売促進部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京
(03) 3504-7811(ダイヤルイン)
FAX (03) 3504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MAR. 1999 VOL. 41 NO. 2

発行 平成11年3月19日
発行人 前田 芳夫
編集人 塚田 勝男
発行所 株式会社日立製作所計測器事業部
科学システム本部技術部

〒100-8220
東京都千代田区丸の内1-5-1(新丸ビル)
電話 東京 (03) 3214-3122(直通)
印刷所 日立印刷株式会社